

**Aus der Abteilung
für Unfallchirurgie
Prof. Dr. Michael Nerlich
der medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

Untersuchung des Einflusses von 17 β -Estradiol auf humane mesenchymale Stammzellen während der chondrogenen Differenzierung

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
medizinischen Fakultät der
Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Corinna Macht**

2011

**Aus der Abteilung
für Unfallchirurgie
Prof. Dr. Michael Nerlich
der medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

Untersuchung des Einflusses von 17 β -Estradiol auf humane mesenchymale Stammzellen während der chondrogenen Differenzierung

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
medizinischen Fakultät der
Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Corinna Macht**

2011

Dekan:

Prof. Dr. Dr. T. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. P. Angele

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. T. Reichert

Tag der mündlichen Prüfung:

06.12.2011

Gewidmet meinen Eltern,
die mir mein Studium ermöglicht
und mich dabei sehr unterstützt haben.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
AK	Antikörper
AR	Androgenrezeptor
BMPs	bone morphogenic proteins
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CDMPs	chondrocyte derived morphogenic proteins
DAB	3,3 `Diaminobenzidin
DMMB	Dimethymethylenblau
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
ECM	extracellular matrix
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale NO-Synthetase
ER	estrogen receptor
ERE	estrogen responsive element
EUR	Euro
FCS	Fetales Kälber-Serum
GAG	Glycosaminoglycane
GP(C)R	G-protein coupled receptor
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GOA	generalized osteoarthritis
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
gr.	griechisch
GS	goat serum (Ziegenserum)
hMSCs	humane mesenchymale Stammzellen
HSP	Hitzeschockprotein
IGF-1	insuline like growth factor-1
IL	Interleukin
IST	Insulin, Transferrin, Selenium
JNK	Jun-amino-terminal kinase
kDa	Kilo-Dalton
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LIF	leukaemia inhibitory factor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mio.	Millionen
MMPs	Matrix Metalloproteasen
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
MR	Mineralokortikoid-Rezeptor
Mrd.	Milliarden
MSZ/MSC	mesenchymale Stammzellen

MW	Molekulargewicht
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthetase
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OA	Osteoarthrose/-arthritis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PR	Progesteron-Rezeptor
RIPA	radio-immuno-precipitation-assay
SAPK	stress-activated protein kinase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SERM	selective estrogen receptor modulator
sog.	so genannte(s/r)
Sox9	SRY (sex determining region Y)-box 9
syn.	synonym
TE	tissue engineering
TGF- β	transforming growth factor- β
TIMPs	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	tumor necrosis factor
UV	ultraviolett
v. a.	vor allem
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	i
Inhaltsverzeichnis.....	iii
1 Einleitung	1
1.1 Der Knorpel	1
1.2 Die Osteoarthritis	4
1.2.1 Einteilung der Arthroseerkrankungen.....	5
1.2.2 Pathogenese der Osteoarthritis und beteiligte Botenstoffe	6
1.2.3 Die MAP-Kinasen-Kaskade	9
1.3 Therapie bei Knorpelschäden & Tissue Engineering.....	13
1.4 Mesenchymale Stammzellen & Chondrogenese.....	14
1.5 Östrogene	16
1.5.1 Knorpel und Östrogen	16
1.5.2 Wirkmechanismen des Östrogens	18
1.6 Zielsetzung	23
2 Material und Methodik.....	24
2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	24
2.2 Methodik	32
2.2.1 Allgemeine Versuchsvoraussetzungen	36
2.2.2 Versuch über 21tägigen Differenzierungszeitraum: Kollagen II-, GAG- sowie DNA-Bestimmung und Histologie.....	41
2.2.3 MAPK-Stimulationsexperimente mittels Western Blot- Technik	49
3 Ergebnisse	57
3.1 Einfluss von 17 β -Estradiol auf die Kollagen Typ II-Expression	57
3.2 Einfluss von 17 β -Estradiol auf die Glykosaminoglykan-Expression.....	58
3.3 DNA-Gehalt	60
3.4 Histologie	61
3.4.1 Kollagen Typ II-Immunhistochemie	61
3.4.2 Dimethylmethylenblau-Färbung	62

3.5	Western Blot.....	63
3.5.1	Nachweis der beiden klassischen Steroidrezeptoren ER- α und ER- β	63
3.5.2	Etablierung der Western Blot-Technik zur Detektion der MAPK.....	64
3.5.3	MAPK-Aktivierung durch 17 β -Estradiol	66
4	Diskussion	77
5	Ausblick.....	90
6	Zusammenfassung.....	92
	Literaturverzeichnis	93
	Abbildungsverzeichnis.....	108
	Tabellenverzeichnis.....	111
	Selbstständigkeitserklärung.....	112
	Danksagung.....	113
	Lebenslauf.....	114

1 Einleitung

1.1 Der Knorpel

Knorpelgewebe ist ein spezielles Bindegewebe mit Stützfunktion. Seine Eigenschaften werden von den Komponenten der extrazellulären Matrix bestimmt. Vier Knorpelformen lassen sich unterscheiden: Fetalen Knorpel, hyalinen Knorpel, elastischen Knorpel und Faserknorpel; Der hyaline (gr. Hyalos = Glas) Knorpel ist der am meisten verbreitete Knorpeltyp beim Erwachsenen und kann in Form des Gelenkknorpels das ganze Körpergewicht tragen. Er ermöglicht bei statischer und dynamischer Belastung gleichermaßen eine effektive Stoßdämpfung sowie ein nahezu reibungsfreies Gleiten der artikulierenden Gelenkflächen (Welsch, 2003). Die Herstellung hyalinen Knorpels mittels Tissue Engineering ist mit großen Hoffnungen für die Therapie fokaler Gelenkflächenschäden verbunden (Goessler, 2005; Marlovits, 2004). Diese Arbeit beschäftigt sich deshalb im Wesentlichen mit hyalinem Knorpel. Als funktionelle Einheiten des Knorpels fungieren in Gruppen (Chondrone) zusammenliegende Chondrozyten, die zumeist in kugelförmigen oder sphäroiden Knorpelhöhlen angeordnet sind und von einer festen Kapsel umschlossen werden. Neben Chondrozyten sind Wasser (zu einem Massenanteil von 70-80 %) und die extrazelluläre Matrix (ECM) die beiden anderen Hauptbestandteile des hyalinen Knorpels. Verglichen mit anderen Geweben ist der Zellanteil mit 1-10 % niedrig (Hunziker, 2002). In den interzellulären Zwischenräumen finden sich kollagene Fasern, die von einer durchscheinenden, proteoglykanreichen Grundsubstanz „maskiert“, d.h. umhüllt sind (Rohen, 2001). Innerhalb der Knorpelsubstanz zeigen die kollagenen Fasern eine charakteristische Anordnung, die einer trajektorialen Struktur entspricht und eine Unterscheidung funktioneller und struktureller Schichten erlaubt. Betrachtet man den hyalinen Knorpel von der Knorpeloberfläche ausgehend, so stößt man zuerst auf die sog. Tangentialzone. Diese Schicht weist den höchsten Kollagengehalt auf (Poole, 1996). Es folgt die mittlere Schicht, die Transitionalzone, die tiefe Zone, die Radialzone und die kalzifizierte Mineralisierungszone, welche den Übergang zum subchondralen Knochen darstellt (Pullig, 2001). In dieser

Schicht verankern sich die Faserbündel. Das strukturelle Äquivalent für diesen Schichtenaufbau sind die kollagenen Fasern. Diese verlaufen senkrecht zur Oberfläche des Knorpels (Radialzone) und bilden ubiquitäre zirkuläre Wickelungen um die Chondrone. Während die Kollagenfibrillen in der Transitionalzone keine Vorzugsrichtung aufweisen, biegen sie an den Gelenkflächen arkadenförmig um und gehen in eine tangential Verlaufsrichtung über (Tangentialzone) (Hunziker, 2002). Zug- und Druckspannungen bewirken somit eine gleichmäßige Beanspruchung der Knorpelzellen. Jede einseitige Druck- oder Zugspannung wird in hydrostatischen Druck umgewandelt. Der Knorpel als druckelastisches Gewebe schützt den darunter liegenden Knochen vor einseitiger Belastung.

Die von den Chondrozyten produzierte ECM besteht im Wesentlichen aus zwei, je nach Schicht in ihrer Konzentration variierenden Hauptbestandteilen, den Glykosaminoglykanen (GAGs) (vor allem Hyaluronsäure und das mit ihm verbundene Aggrecan) und den kollagenen Fasern. Proteoglykane bestehen prinzipiell aus einem Kohlenhydratseitenketten tragenden Proteinrückgrad (Welsch, 2003). Die für die Bildung der ECM bedeutende Hyaluronsäure enthält keinen Proteinanteil. Dem hohen Proteoglykangehalt des Knorpels ist seine elastische Fähigkeit zu verdanken: Dank ihres hydrophilen Charakters binden die Keratan- und Chondroitinsulfatketten des Aggrecans viel Wasser. Das Kollagen vom Typ II ist der für den hyalinen Knorpel charakteristische ECM-Bestandteil. Es gehört mit den Kollagenen I und III der Gruppe der fibrillären Kollagene an, welche als gemeinsames Strukturmerkmal die Tripelhelix aufweisen. Weitere knorpeltypische Matrixbildner sind Kollagen vom Typ IX (verbindet die Typ-II-Fibrillen) und Kollagen vom Typ XI. Die Kollagen-Typen I und X kommen im hyalinen Knorpel nur marginal vor. Kollagen Typ I findet sich lediglich in der obersten dünnen Schicht, welche für die besondere Festigkeit gegenüber tangentialer Belastung verantwortlich ist. Beim Typ X handelt es sich um ein Ca^{2+} -bindendes Protein, das nur von terminal differenzierten oder hypertrophen Chondrozyten in der Nähe der Grenzfläche zum Knochen produziert wird (Welsch, 2003). Sein Anteil am Gesamt-Kollagen ist im

hyalinen Knorpel sehr klein, nimmt aber bei fortschreitender Arthrose zu (Pullig, 2001; Stephens, 1992; Walker, 1995).

Proteoglykane und Hyaluronat bilden mit den Kollagenen ein dreidimensionales Netzwerk. Die räumliche Anordnung dieses Netzwerkes ergibt sich dabei durch Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Aminosäureresten der Kollagenfasern sowie negativen Ladungen auf den Proteoglykanen.

Intraartikuläres Knorpelgewebe weist im Vergleich zu anderen Geweben einige Besonderheiten auf: Es ist normalerweise weder innerviert noch vaskularisiert und lediglich aus einem Zelltyp aufgebaut. Des Weiteren besitzt es keine geschlossene Zellbedeckung und muss durch Diffusion aus der umgebenden Synovialflüssigkeit ernährt werden. Damit stellt es ein bradytrophes Gewebe dar - eine Prädestination für Gewebsschädigung (Hunziker, 2002).

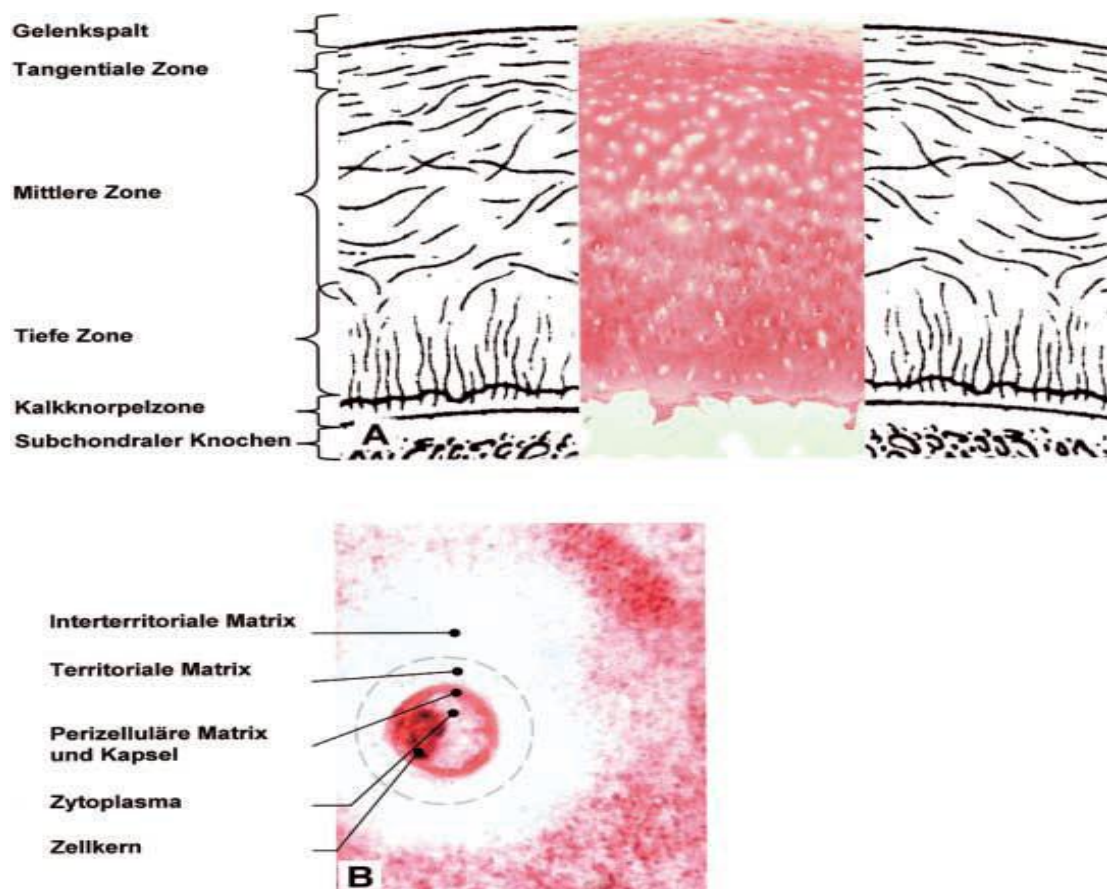


Abbildung 1-1: (A) Aufbau des artikulären Knorpels. (B) Darstellung eines Chondrons (Abbildung aus Molekulare Grundlagen der Arthroseinduktion und -progression, Pullig, 2001)

1.2 Die Osteoarthritis

Die OA (syn. Arthrosis deformans) ist definiert als eine primär nicht-entzündliche Gelenkserkrankung, die durch eine degenerative Zerstörung des Gelenkknorpels imponiert. Im Allgemeinen wird als Ursache des Gelenkverschleißes ein Missverhältnis zwischen verminderter mechanischer Resistenz und erhöhter mechanischer Belastung des Gelenkknorpels angeführt (Swoboda, 2001).

Typische Symptome sind Schmerzen, Gelenksteifheit und eingeschränkte Bewegungsfähigkeit. Morphologische Korrelate zeigen sich in Gelenkknorpelerweichungen, –auffaserungen und subchondralen Zystenbildungen. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium treten subchondrale Sklerose und Osteophytenbildung auf (Hashimoto, 2002). Allgemein kommt es zur klinisch fassbaren Gelenkdeformierung.

Die Arthrose ist eine der häufigsten (Thiem, 2008; Swoboda, 2001) chronischen und volkswirtschaftlich bedeutsamen Krankheiten des Erwachsenen im höheren Alter. Die Kosten, die aus diesem Krankheitsbild resultieren werden in der BRD auf 3,5 – 5,4 Mrd. EUR/Jahr geschätzt. Das entspricht gut 3 % der gesamten direkten Krankheitskosten (Schneider, 2005). Prinzipiell kann sich an jedem Gelenk des Körpers eine Arthrose manifestieren, am häufigsten finden sich Gonarthrosen, Coxarthrosen und Spondylarthrosen (Sun, 1997). Millionen von Menschen sind davon betroffen: Ältere häufiger als junge, Frauen häufiger als Männer. Vor allem in den Jahren nach der Menopause erfolgt eine eindruckliche Zunahme dieser Erkrankung beim weiblichen Geschlecht (Richette, 2003; Holzer, 2000). Bereits um das 40. Lebensjahr finden sich bei der Hälfte der Bevölkerung erste, klinisch meist noch inapparente, röntgenologische Hinweise auf degenerative Skelettveränderungen. Aufgrund des demographischen Wandels wird die OA in der Zukunft weiterhin an Bedeutung gewinnen.

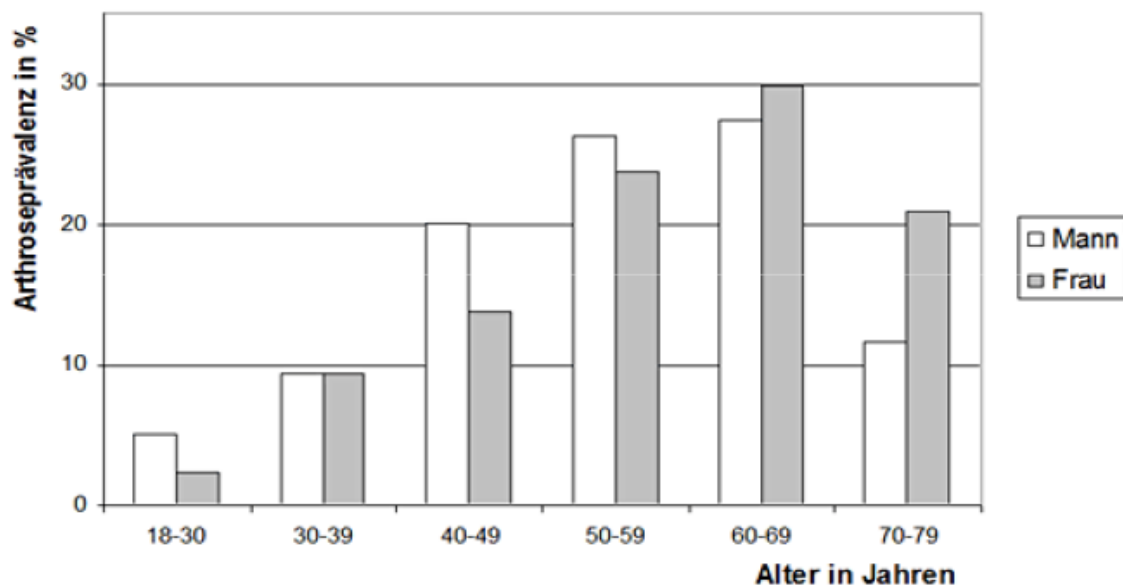


Abbildung 1-2: Arthroseprävalenz in Deutschland (Abbildung aus *Estrogens, cartilage and osteoarthritis*, Richette, 2003)

1.2.1 Einteilung der Arthroseerkrankungen

OA wird in primäre (syn. genuine, idiopathische) und sekundäre Arthroseformen eingeteilt (Herrero-Beaumont, 2009). In der Gruppe der Primärarthrosen liegt eine, am ehesten genetisch disponierte Minderwertigkeit des Knorpelgewebes vor. Bei den Sekundärarthrosen bedingen knorpelschädigende Einflüsse oder Noxen die Knorpeldegeneration. Diese Einflüsse können auf eine Vielzahl bekannter Faktoren wie Übergewicht, Dysplasien, Achsenfehlstellungen, Versteifung benachbarter Gelenke, Traumata, intraartikuläre Frakturen oder Luxationen sowie entzündliche Gelenkprozesse (Spätfolge der Arthritis) zurückgeführt werden (Sandell, 2001). Darüber hinaus spielen Wachstumsstörungen (Epiphyseolysis capitis femoris), Knochenerkrankungen (Osteoporose) sowie metabolische (z. B. Gicht oder Chondrokalzinose), chemische, trophische, neurologische oder endokrine Erkrankungen (wie z. B. die Hypothyreose) in der OA-Ätiologie eine Rolle (Pullig, 2001). Auch eine medikamentös bedingte Arthrosebildung beispielsweise durch Antibiotika vom Typ der Gyrasehemmer (Fluorchinolone) wird in der Literatur beschrieben (Steinmeyer, 2001).

Für den Kliniker stellt die Einteilung in primäre und sekundäre Arthrosen eine hilfreiche Klassifikation dar. Sie ist jedoch nicht unumstritten, da die aufgezeigte Einteilung nicht der enormen Komplexität und Heterogenität der ätiologischen Faktoren bei der OA-Entstehung gerecht werden kann (Herrero-Beaumont, 2009; Sandell, 2001).

1.2.2 Pathogenese der Osteoarthrose und beteiligte Botenstoffe

Auf der Gewebsebene zeigen sich ein biologisch und mechanisch bedingter Verlust des Gelenkknorpels, ein Umbau des subchondralen Knochens sowie eine entzündliche Reaktion der Synovia. Die mangelnde postnatale Regenerationsfähigkeit des Knorpelgewebes gilt als maßgeblich für die Entwicklung der Arthrose (Buckwalter, 2005). Die Chondrozyten versagen bezüglich der Kompensation des enzymatisch und mechanisch verursachten Abbaus der extrazellulären Matrix (Pfander 2001) und es herrscht ein Ungleichgewicht zwischen dem Auf- und dem Abbau der ECM (Sandell, 2001).

Zwei Phasen werden unterschieden: Die Synthesephase, in der die Chondrozyten durch verstärkte Produktion der ECM-Komponenten den katabolen Zustand auszugleichen und damit die geschädigte Matrix zu reparieren versuchen und die fortschreitende Erschöpfung der Syntheseleistung, was zu einem Nettoabbau der ECM und damit zur fortschreitenden Knorpelzerstörung führt (Westacott, 1996; Hamerman, 1989). Die vollständigen pathophysiologischen Grundlagen sind noch nicht geklärt, allerdings sind einzelne beteiligte Faktoren bekannt.

Matrix Metalloproteasen

Bei der Knorpel-Degradation spielen die sog. Matrix Metalloproteasen (MMPs) eine entscheidende Rolle (Burrage, 2006; Fernandes, 2002): Diese zinkabhängigen Enzyme sind in der Lage alle Bestandteile der Extrazellulär-Matrix an spezifischen Aminosäurestellen zu spalten und abzubauen. Von den MMPs abgebaute Bruchstücke gelangen in

den Synovialspalt und induzieren dort mechanisch eine lokale Entzündung (Roos, 1995). Die gereizten Synoviozyten reagieren mit der Ausschüttung von Zytokinen, vor allem der katabolen Mediatoren IL-1 und TNF- α (Fernandes, 2002). Diese Zytokine diffundieren in den Knorpel, regen dort wiederum die Expression der MMPs an und der Kreislauf aus Zytokin-Ausschüttung – zytokin-abhängige MMP-Synthese – ECM-Abbau - inflammatorischer Reizung der Synoviozyten mit konsekutiver Zytokin-Ausschüttung beginnt von Neuem. Zusätzlich verringern die Zytokine die Expression von ECM-Komponenten (Goldring, 1999). Diese Aussagen werden durch den Fund erhöhter Expressionsniveaus von bestimmten MMPs im Knorpel von an OA erkrankten Patienten unterstrichen (Aigner, 2001).

Im Gegensatz dazu herrscht in gesundem Knorpelgewebe ein Gleichgewicht zwischen Abbau und Synthese der ECM. Der Matrixumsatz ist genau geregelt: Unter physiologischen Bedingungen kontrollieren spezifische Gewebeinhibitoren, die sog. TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases) die MMPs. Bei den TIMPs handelt es sich um Glykoproteine, die eine hohe Affinität zu den MMPs besitzen, Komplexe mit ihnen bilden und so zu deren Inaktivierung führen (Martel-Pelletier, 1996).

Zytokine

Die Zytokine, die Einfluss auf den Gelenkknorpelstoffwechsel ausüben, können funktionell in drei Gruppen aufgeteilt werden (Fernandes, 2002; Pfander, 2001):

Destruktiv wirkende Zytokine	IL-1, TNF (tumor necrosis factor), LIF (leukaemia inhibitory factor), IL-17, IL-8;
Regulierende Zytokine	IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TIMP;
Wachstumsfaktoren	IGF, TGF- β , BMPs, CDMPs

Tabelle 1-1: Einteilung der Zytokine

Die destruktiven/katabolen Zytokine, insbesondere das IL-1, induzieren einerseits die Produktion kataboler Metalloproteasen (MMPs), die Bildung der beiden Entzündungsmediatoren Stickstoffmonoxid (NO) (Amin, 1998) und Prostaglandin E₂ sowie eine gesteigerte Apoptose der Knorpelzellen. Andererseits supprimieren sie die Chondrozyten-Proliferation und die Proteoglykan- bzw. ECM-Synthese (Kollagen Typ II). Das erwähnte freie Radikal NO wirkt proinflammatorisch, hemmt ebenfalls die Proteoglykan-Synthese und vermindert die Antwort der Chondrozyten auf IGF-1 (Studer, 2000). Darüber hinaus soll Stickoxid auch bei der Apoptose von Knorpel- und Synovialzellen eine Rolle innehaben (Amin, 1998; Hashimoto, 2002). In Synovia von Arthrosepatienten ließ sich ein Mangel an IL-1-Rezeptor-Antagonisten nachweisen (Fernandes, 2002). Zudem wurden multiple Analogien zur rein inflammatorischen Knorpeldestruktion des Rheumatikers aufgezeigt (Burrage, 2006).

Im Kontrast dazu üben die regulierenden Zytokine knorpelprotektive Effekte aus, indem sie die Produktion von destruktiven Faktoren wie IL-1 und TNF durch Makrophagen und Chondrozyten und die Aktivität der TNF-Rezeptoren hemmen und gleichzeitig die Synthese von deren Inhibitoren steigern. IL-4 übt direkt einen positiven Einfluss auf das Knorpelgewebe aus: Es verringert die Produktion der NO-Synthetase (NOS) (Fernandes, 2002; Pullig, 2001).

Die Wachstumsfaktoren wirken dem katabolen Effekt der destruktiven Zytokine (IL-1 im Besonderen) entgegen, ohne dabei direkt die Produktion oder Wirkung von IL-1 zu verhindern. Zusätzlich fördern sie die Knorpelzellproliferation sowie die ECM-Synthese. Unter den Wachstumsfaktoren stellt der insuline like growth factor-1 (IGF-1) den bedeutendsten anabolen Faktor dar (McQuillan, 1986; Osborne, 1989; Rickard, 1993). IGF-1 wird von den Chondrozyten selbst produziert und verringert einerseits den Proteoglykan-Abbau, andererseits steigert er die Proteoglykan-Synthese in Chondrozyten. Bei OA-Patienten wurde eine verminderte IGF-1-Konzentration im Serum beschrieben, während lokal im arthrotischem Gewebe IGF-1 intrazellulär vermehrt ist (Denko, 1990). Außerdem fördert IGF-1 die chondrogene Differenzierung in vitro.

Weitere Chondrozyten beeinflussende Wachstumsfaktoren sind TGF- β (transforming growth factor- β), BMPs (bone morphogenic proteins) und CDMPs (chondrocyte derived morphogenic proteins). TGF- β gilt im Allgemeinen sowohl als Stimulator der Kollagen-, als auch der Proteoglykan-Synthese. In gesundem Knorpel vermag TGF- β die Proteoglykan-Synthese nur gering zu stimulieren, jedoch werden die Chondrozyten bei längerer TGF- β -Exposition aufgrund einer Phänotyp-Veränderung sensibilisiert, was zu vermehrter Proteoglykan-Bildung führt (Westacott, 1996). Außerdem besitzt TGF- β einen chemotaktischen Effekt: Leukozyten wandern in die Synovia ein.

1.2.3 Die MAP-Kinasen-Kaskade

Die Mitogen-activated protein kinases-Kaskade (MAPK-Kaskade) - auch als Phosphotyrosin-Kinase-Signalweg bezeichnet - stellt einen Signaltransduktionsweg von großer Bedeutung in Zellprozessen - angefangen von der Proliferation über die Differenzierung bis hin zur Apoptose - dar. Eine gesteigerte Expression der Matrix Metalloproteasen nach Stimulation der MAP-Signaltransduktionskaskaden wurde beschrieben, eine Beteiligung an der OA-Entstehung wird vermutet (Sondergaard, 2009).

Aktiviert von einer enormen Vielzahl von verschiedensten Zelloberflächen-Agonisten, aber auch von physikalischen Umweltbedingungen wie pH-Wert-Änderungen, Druck, Strahlung oder Temperatur, setzt sich eine komplexe Abfolge von Phosphorylierungen in Gang, an deren Ende die Phosphorylierung zahlreicher Proteine, darunter Transkriptionsfaktoren, Proteine des Zytoskeletts, Kinasen und andere Enzyme, steht. Somit beeinflussen sie die Gen-Expression, ebenso wie den Zell-Stoffwechsel, die Zell-Teilung, die Zell-Morphologie, die Zell-Motilität und das Zell-Überleben.

Die MAPK-Pathway-Aktivierung durch 17 β -Estradiol wurde bei mehreren Zellarten beschrieben. So werden MAP-Kinasen in Osteoblasten und Osteoklasten von 17 β -Estradiol aktiviert. Ein Zusammenhang mit proliferativen und antiapoptotischen

Östrogeneffekte sowie der knochenprotektiven Östrogenwirkung wird diskutiert (Kousteni, 2001).

Das empfangene Aktivierungs-Signal wird in einer dreigestaffelten Kaskade über die Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK oder auch MEKK, MAP3K, MKKK), die Mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK oder MEK, MAP2K, MKK) und schließlich die Mitogen-activated protein-kinase (MAPK) vom Rezeptor zum Nucleus übermittelt. Zum Teil wird die MAPKKK auch von einer MAPKKK-Kinase (auch MAP4K, MKKKK) oder/und von einem small GTP-binding protein der Ras/Rho Familie aktiviert (Roux und Blenis, 2004). Auf jeder der drei Ebenen sind mehrere Vertreter der Enzyme vorhanden, was bereits einen ersten Hinweis auf die außerordentliche Komplexität dieses Signaltransduktionswegs liefert. In der vorliegenden Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf die Ebene der MAP-Kinasen gelegt: In Säugerzellen wurden bisher fünf verschiedene MAPK-Familien (basierend auf Sequenz-Homologie) definiert: die extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), die Jun N-terminal kinases (JNK1/2/3), die p38-Isoformen (p38 α / β / γ / δ), ERK3/4 und ERK5 (Chang, 2001; Roux, 2004, Qi, 2005). Allerdings lässt die Entdeckung von bereits sechs MAPK bei *Saccharomyces cerevisiae* im Hinblick auf die relative Komplexität des menschlichen Genoms die Existenz weiterer MAPK in Vertebraten sehr wahrscheinlich werden. Von den fünf aufgeführten Kinasen können die ersten drei, also ERK1/2, JNK und p38 als die am besten studierten Proteine bezeichnet werden. Diese Tatsache ließ sie auch für diese Arbeit in den Fokus des Interesses rücken.

Generell werden MAPK durch eine zweifache Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosinresten innerhalb des Aktivierungsloops von einer MAPKK aktiviert und versehen dann ihrerseits ihre Zielproteine an Serin- und Threoninresten mit einer Phosphatgruppe. Somit ist die Phosphorylierung der MAP-Kinasen mit ihrer Aktivierung gleichzusetzen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression der Total-MAPK mittels Immunodetektion ermittelt und als Referenz für die Beurteilung der aktiven Form die Phospho-MAP-Kinase herangezogen. Allerdings besitzen die einzel-

nen MAPK eine Vielzahl unterschiedlicher Targets, so dass sich dadurch auch die Komplexität der Effekte von ERK1/2, JNK und p38 erklären lässt.

Das ERK1/2-Modul der Säugetiere repräsentiert die klassische Kaskade mitogener Kaskaden. ERK1/ERK2 regulieren Proliferation, Differenzierung, Meiose und das Zell-Überleben. Sie werden hauptsächlich von mitogenen Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Phorbolestern aktiviert. Viele Zielobjekte von ERK1/2 sind bekannt: Wesentliche Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NFκB, c-myc, Kinasen wie Rsk, der Zellüberlebensregulator Bcl-2 und der zytoskelettale Stabilisator Paxillin. In Abhängigkeit der Intensität und Dauer der Stimulation kann die ERK-Aktivierung entweder in Proliferierung oder in Differenzierung resultieren (Marshall, 1995). Aufgrund ihrer Bedeutung bei der Zellvermehrung spielt die extracellular signal-regulated kinase auch in der Tumorforschung (z. B. beim Mamma-Carcinom: Santen, 2002) eine wichtige Rolle. Die beiden Isoenzyme ERK1 und ERK2 weisen eine Homologie von 83 % auf (Roux, 2004) und besitzen ein Molekulargewicht von 42 und 44 kDa, weswegen sie auch als p42 und p44 betitelt werden.

Für die p38 MAPK wurde eine Beteiligung an der Entzündungsreaktion, der Zellmotilität, der Osmoregulation und der Apoptose beschrieben. In der Literatur wird auch eine Mitwirkung von p38 bei Asthma und der Autoimmunität beim Menschen aufgezeigt. Außerdem haben Gen-Experimente gezeigt, dass p38α bei der Angiogenese und der Epo-Produktion involviert ist (Qi, 2005).

Die Mitglieder der JNK-Familie spielen bei der Stressantwort, bei der neuronalen Entwicklung, bei der Tumorgenese, bei der Inflammation und bei der Apoptose eine Rolle. Aktiviert werden auch sie durch multiple Stressfaktoren wie z. B. Strahlung, DNA-schädigende Agentien, den Entzug oder die Gabe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Ihre Aktivierung läuft allerdings wesentlich komplexer als bei ERK ab, was auf eine größere Anzahl an MAPKKs zurückgeführt wurde. JNK1 und JNK2 sind die Produkte alternativen Splicens eines einzigen Gens und werden in vielen Geweben exprimiert (Qi, 2005).

MAPK-pathways sind extrem komplex vernetzte intrazelluläre Signalwege. Vereinfacht kann man jedoch sagen, dass sich die Aktivierung von ERK1/2 mit einer Proliferation und die Aktivierung von p38 und JNK mit Inflammation und dem Apoptosebeginn verbinden lassen. Des Weiteren wird ERK als Antwort auf Wachstumsfaktoren stimuliert, wohingegen JNK und p38 wenig sensitiv auf Wachstumssignale, sondern vor allem auf umweltbedingten chemischen oder physikalischen Stress und proinflammatorische Signale reagieren, weswegen diese beiden auch als Stress-Kinasen bezeichnet werden (Lavoie, 1996).

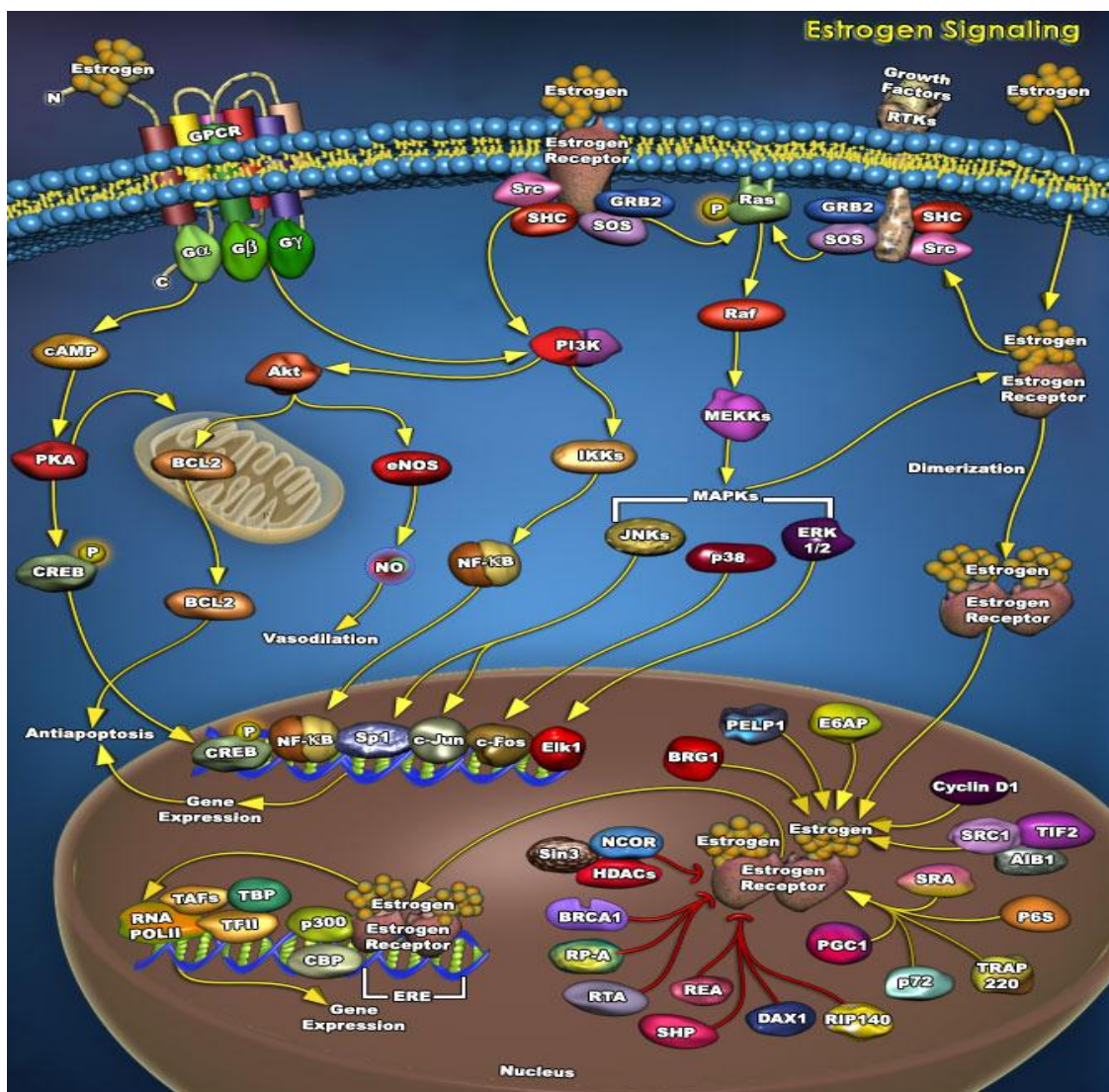


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des MAPK-Pathway (Abbildung der Firma Ambion)

1.3 Therapie bei Knorpelschäden & Tissue Engineering

Die Behandlung der Arthrose beruht auf drei Säulen: medikamentöse, nicht-medikamentöse und operative Maßnahmen; Bei den konservativen Verfahren steht neben der Physiotherapie als wichtigste nicht-operative Behandlung die Einnahme von schmerzlindernden und entzündungshemmenden Pharmaka im Vordergrund. Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAR), Analgetika und intraartikulär applizierte Glukokortikoide können hierfür als Standardmedikamente angeführt werden. Allerdings existieren gegenwärtig keine klinischen Studien, dass Arzneistoffe beim Menschen morphologisch erkennbare Knorpeldefekte verhindern, die fortschreitende Gelenkknorpelzerstörung zumindest verlangsamen und/oder rückgängig machen können (Steinmeyer, 2001). Insofern gewannen die operativen Verfahren an Bedeutung. Bei schon weit fortgeschrittenen Arthrosestadien ist eine gelenkerhaltende Vorgehensweise oft nicht mehr möglich. Der künstliche Gelenkersatz (Totalendoprothese, TEP), die Arthrodesen (Gelenksversteifung) und bei enger Indikationsstellung die gelenkerhaltende Korrekturosteotomie (Knochenumstellung) repräsentieren die gängigsten Verfahren. In frühen Krankheitsstadien, nach Traumata oder auf ausdrücklichen Patientenwunsch kommen invasive gelenkerhaltende Verfahren wie beispielsweise das arthroskopische Débridement, das Shaving (Spahn, 2002), die Pridie-Bohrung oder die subchondrale Abrasionsarthroplastik (Johnson, 2001) zum Einsatz. Diese Verfahren liefern gute Kurzzeitergebnisse, allerdings schreitet langfristig der Knorpeldefekt trotzdem voran (Friederich, 2002).

Weitere chirurgische Verfahren, die vornehmlich bei fokalen, meist traumatisch bedingten Knorpeldefekten zum Einsatz kommen, stellen die Knorpel-Knochen-Transplantation und die sog. „Mosaikplastik“ dar. Bei dieser Methode werden kleine osteochondrale Zylinder mosaikförmig in einen Knorpeldefekt eingestanz. Dieses Verfahren ist jedoch auf kleine Defekte limitiert (Hangody, 2003). Zudem kann mit den genannten Methoden nur eine Defektauffüllung mit biomechanisch nicht kompetentem Knorpel erreicht werden. Dieser Nachteil stellt ebenso wie das Setzen neuer

Defekte durch die Entnahme an unbelasteter Stelle des Gelenks einen ständigen Diskussionspunkt dar. Das Verfahren des Tissue Engineerings (Gewebezüchtung) versucht lebende Zellen außerhalb des Zielgewebes zu kultivieren und anschließend zu reimplantieren. Ein Vorteil eines derartigen autologen Implantats besteht darin, dass es vom Immunsystem des Patienten akzeptiert wird und so Abstoßungsreaktionen vermieden werden. Die Ansätze im Tissue Engineering bei Knorpelgewebe werden in zwei Gruppen unterteilt: Die Gewebebildung durch Aggregation adulter Chondrozyten (autologe Chondrozytentransplantation, ACT), im Gegensatz zur chondrogenen Differenzierung aus mesenchymalen Stammzellen. Bei der autologen Chondrozytentransplantation (Marlovits, 2004) werden einem Patienten an einer unbelasteten Stelle des Gelenks entnommene Chondrozyten in vitro über etwa sechs Wochen vermehrt, um sie dann in die Defektstelle zu reimplantieren. Nachteile sind die Entnahmemorbidität und die Gefahr der Dedifferenzierung der Zellen (Goessler, 2005, 2006; Yu, 2006).

Um die beschriebene Problematik der Dedifferenzierung adulter Stammzellen im Rahmen der in vitro-Vermehrung zu umgehen, setzt man in der regenerativen Medizin vermehrt auf das Vermehrungs- und Differenzierungsvermögen mesenchymaler Stammzellen.

1.4 Mesenchymale Stammzellen & Chondrogenese

Multipotente Stammzellen (hMSCs) stammen beim Menschen ursprünglich aus dem Mesoderm. Man bezeichnet sie als multipotent, da sie die Fähigkeiten zur Teilung und zur Entwicklung in differenzierte Zelltypen eines Gewebes in sich vereinen (Czyz, 2003, Lange, 2005). Mit dem Alter nimmt die Zahl der hMSCs im Knochenmark annähernd exponentiell ab (Caplan, 1991). In Studien wurde diesem Zelltypus ein chondrogenes Differenzierungspotential bescheinigt (Barry, 2001).

Die Entstehung des Knorpelgewebes, die Chondrogenese, ist ein komplexer Prozess und beginnt mit der Proliferation und Kondensation mesenchymaler Stammzellen

(Goldring, 2006). Sog. Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) initiieren im weiteren Verlauf die Expression des Transkriptionsfaktors Sox9, welcher als Marker-Gen für die Chondrogenese bezeichnet wird (Lefebvre, 2005). Er reguliert direkt die Expression der Gene für Kollagen Typ II, Typ XI und für Aggrecan (Sekiya, 2000). Nach Beginn der Kondensation der mesenchymalen Zellen entstehen im Zentrum zunächst Prächondrozyten. Gleichzeitig wird Kollagen Typ II exprimiert, während die Expression der Marker undifferenzierter Zellen abnimmt (Lefebvre, 2005). Die Weiterentwicklung der Prächondrozyten zu frühen Chondroblasten geht mit einem Anstieg der Zellproliferation und der Matrixproduktion einher. Die Zellen bilden verstärkt Kollagen Typ II und Aggrecan. Link-Protein, Kollagen Typ IX und Typ XI werden erstmals nachweisbar (Lefebvre, 2005). In der nächsten Phase proliferieren die Zellen weiter, um schließlich zu reifen Chondrozyten auszudifferenzieren.

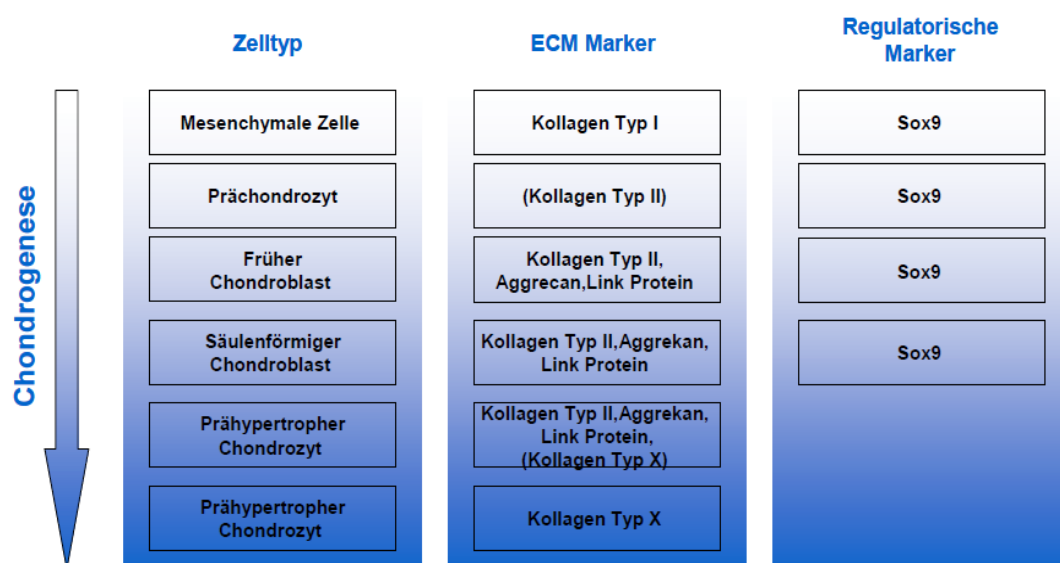


Abbildung 1-4: Vereinfachte Darstellung einzelner Schritte der Chondrogenese mit den wichtigsten Markerproteinen (Abbildung aus *Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation*, Lefebvre, 2005)

Aktuelle Studien konnten eine Wirkung von 17β -Estradiol auf hMSCs zeigen, die über die Proteinkinase C- (PKC), die Phosphatidylinositol 3-Kinase- (PI3K) und die MAPK-Pathways vermittelt wurden (Yun, 2009).

1.5 Östrogene

Östrogene sind Steroidhormone, die vor allem in den Ovarien, in der Plazenta, in den Nebennieren und beim Mann in geringen Mengen auch im Hoden gebildet werden. Östrogene kommen in vielfältigen Strukturvarianten vor. 17β -Estradiol hat das größte Vorkommen im menschlichen Körper und besitzt die höchste Wirksamkeit. Es wird hauptsächlich im reifenden Follikel unter dem Einfluss von FSH in den Thekazellen gebildet. Hervorzuheben ist seine Wirkung im Reproduktionstrakt, in der Brustdrüse, im ZNS und auch im Skelettsystem (Couse, 1999). Neben seiner protektiven Funktion als wesentlicher Wachstums- und Differenzierungsregulator in einer Vielzahl von Zielgeweben, ist 17β -Estradiol ebenso in viele Pathologien wie Brust- und Endometrium-Carcinome (Henderson, 1988) oder Osteoporose (Horowitz, 1993) involviert.

1.5.1 Knorpel und Östrogen

Laut epidemiologischen Beobachtungen erkranken Frauen insgesamt häufiger an Arthrose als Männer. Männer erkranken allerdings häufiger in jüngeren Jahren, d.h. vor dem Alter der weiblichen Menopause. Bei Frauen steigt die OA-Prävalenz zum Zeitpunkt der Menopause bzw. danach bedeutend an (Richette, 2003). Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob das Östrogendefizit nach der Menopause das Arthroserisiko steigert (Roman-Blas, 2009; Felson, 1998, Van Saase, 1989).

Erste Erkenntnisse über einen Einfluss der Sexualhormone auf die Ätiologie und die Pathogenese von Gelenkerkrankungen können bis zu den Anfängen der Medizin zurückverfolgt werden (Holzer, 2000). Schon Hippokrates geht in seinem Buch „Über Frauenkrankheiten“ (in: Grensemann, 1982) darauf ein, ebenso wie Celsus (in: Spencer,

1935). Auch Charcot findet einen Zusammenhang zwischen Polyarthrititis und hormonellen Umstellungen im Laufe des Lebens einer Frau (in: Bourneville, 1890). Später tauchen Begriffe wie „klimakterische/menopausale Arthritis“ oder auch „Arthropathia climacterica“ in der Literatur (z. B. bei Cecil und Archer, 1925) auf. Trotz dieser einheitlichen und weit zurückreichenden Beschreibungen des klinischen Bildes sind die Arbeiten über die Rolle von Östrogenen bei Knorpelerkrankungen insgesamt widersprüchlich und oft schwer zu interpretieren (Holzer, 2000). Eine Vielzahl an Studien zeigt, dass Frauen unter Hormonersatztherapie (engl. Hormone Replacement Therapy, HRT) ein geringeres Arthroserisiko besitzen (Felson, 1998).

Die Identifizierung der zwei Östrogenrezeptoren alpha und beta (ER α und ER β) in Chondrozyten belegt die Östrogen-Sensitivität dieses Gewebes (Ushiyama, 1999).

So bedingten intraartikuläre Östrogen-Injektionen bei Tieren einen Dosis-abhängigen Effekt: Dosen von 17 β -Estradiol, die über das physiologische Maß hinausgingen, induzierten histologisch nachgewiesene OA, während niedrigere Dosen keinen Effekt erzielten. In einer Studie mit ovariectomierten Schafen zeigte der Kniegelenksknorpel verminderte Widerstandsfähigkeit gegen Kompression. Dieser Effekt wurde durch Östrogensersatztherapie wieder aufgehoben (Turner, 1997). Auch bei ovariectomierten Mäusen inhibierte die Östrogensatzgabe die IL-1-induzierte Knorpeldegradation (Da Silva, 1993).

In vitro-Studien zeigten eine dosisabhängige Änderung im Matrixumsatz von Estradiol-exponierten Chondrozyten: So steigerte sich der Matrixaufbau und -abbau unter Östrogenkonzentrationen, die dem Normal-Level entsprachen. Hingegen wurde unter höheren Dosen die Matrixproduktion gehemmt (Richmond, 2000; Rosner, 1979). Außerdem wurde von einem 17 β -Estradiol-Dosis-abhängigen Effekt auf die Proteoglykan-Synthese von kultivierten Knorpel-Explantaten berichtet (Ng, 1999; Ng, 2001).

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass die vielen – oftmals gegensätzlichen Östrogen-Effekte auf den Knorpel von drei wesentlichen Faktoren abhängen: Von der 17 β -Estradiol-Dosis, dem Alter des Spenders und dem Spendergeschlecht. Eine

Vielzahl an Studien resultierte darin, dass Östrogen in physiologischen Dosisbereichen einen protektiven Effekt erzielt (Richmond, 2000; Turner, 1997; Ng, 1999; Ng, 2001), während es in höheren Dosen katabol wirkt (Rosner, 1979; Ng, 1999; Ng, 2001).

Die Östrogenwirkungen bei der OA lediglich auf die Modulation der ECM-Synthese oder die Degradierung der Matrixproteine zu restringieren, erscheint nicht ausreichend, da neben diesen beiden Faktoren noch multiple andere Einflussmöglichkeiten bestehen (Roman-Blas, 2009; Richette, 2003). Beispielsweise verlangsamt Östrogen den Knochenumsatz des subchondralen Knochens, einen Schlüsselfaktor bei der OA-Pathophysiologie (Roman-Blas, 2009; Burr, 1997).

1.5.2 Wirkmechanismen des Östrogens

In den frühen Sechzigern berichtete Elwood Jensen erstmalig von einem Östrogen-bindenden Protein (Jensen, 1962). 1986 gelang es, den ersten Östrogenrezeptor zu klonen (Green, 1986) (dieser sollte später als ER α bezeichnet werden). Sexualhormone üben ihre Wirkungen über eine Reihe komplexer Mechanismen auf molekularer Ebene aus. Es lassen sich zwei Wege unterscheiden:

1. Genomisch/klassisch liganden-abhängig
2. Nicht-genomisch

Es existieren unzählige Verbindungen und gegenseitige Beeinflussungsmöglichkeiten zwischen diesen beiden Wegen, was die Komplexität des Systems verdeutlicht.

Östrogen-Rezeptoren und genomische Östrogenwirkung

Nach dem klassischen Modell entfalten Steroidhormone ihre Wirkung über die Bindung an intrazelluläre Rezeptoren der Steroidrezeptor-Superfamilie, der die Östrogenrezeptoren ER α und ER β sowie die Rezeptoren für Progesteron (PR), Androgene (AR),

Glukokortikoide (GR) und Mineralokortikoide (MR) angehören. Diese Klasse von Rezeptoren stellen ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren dar, welche die Eigenschaft verbindet, dass sie die Regulation einer Vielzahl von biologisch relevanten Genen innehaben. Beispielsweise vermögen sie wesentliche Prozesse bei Reproduktion, Entwicklung oder Homöostase zu modulieren. ER α und ER β , beide von eigenständigen Genen kodiert, weisen einen hohen Grad an Homologie auf (Hall, 2001). Sie setzen sich aus drei unabhängigen, interagierenden funktionellen Domänen zusammen: Der N-terminalen A/B-Domäne, der zentral lokalisierten DNA-bindenden C-Domäne und der liganden-bindenden D/E/F-Domäne. Die variable Region D wird auch als Scharnierregion („hinge-region“) bezeichnet (Nilsson, 2001). Die liganden-unabhängige transkriptionale Aktivität der ER wird von den beiden Aktivierungsfunktionen AF-1 und AF-2 vermittelt. Während AF-1 am N-Terminus in der A/B-Domäne lokalisiert ist, befindet sich AF-2 in der C-terminalen Ligandenbindungsdomäne (LBD). Die Funktion von AF-1 wird durch Phosphorylierung reguliert und ist hormonunabhängig, jedoch auf einige Kofaktoren angewiesen. Im Gegensatz dazu ist AF-2 hormon- bzw. ligandenabhängig. Die AFs arbeiten in den meisten liganden-abhängigen Aktivierungen synergistisch, sie können in gewissen Zell- und Promotorkonstellationen allerdings auch unabhängig funktionieren (Hall, 2001). Die beiden ER-Subtypen üben unterschiedliche biologische Funktionen aus (Zhao, 2008), was sich in den spezifischen Expressionsmustern der ERs in den verschiedenen Geweben widerspiegelt: ER α ist vorrangig in der Brust, im Uterus, in der Cervix, in der Vagina und in der Leber vorherrschend, was durch unterschiedliche Phänotypen in ER α - und ER β -Knockout-Mäusen gezeigt werden konnte. ER β scheint in den Ovarien, der Prostata, den Testes, der Milz, der Lunge, dem Hypothalamus und dem Thymus den dominanten Rezeptor darzustellen (Hall, 2001; Couse, 1997). Eine weitere Differenzierung zwischen den beiden Östrogen-Rezeptor-Subtypen ist in deren spezifischen, jedoch auch zum Teil überlappenden Zielgenen zu finden (Zhao, 2008). ER α und ER β haben demnach in Abhängigkeit vom jeweiligen Liganden, von Zellarten und von Promotoren unterschiedliche Transkriptions-Aktivitäten.

Der Östrogen-Rezeptor liegt in Abwesenheit eines Liganden in einem Inhibitor-Komplex an Hitze-Schock-Proteine (HSPs) gebunden vor (Hall, 2001). Gelangt Östrogen durch passive Diffusion durch die Plasmamembran, führt dies zu einer Konformationsänderung (in den Tertiär- und Quartärstrukturen des Proteins) und zur Abdissoziation der HSPs vom ER sowie anschließender Homo- und Heterodimerisierung und Phosphorylierung des Rezeptors (Osborne, 2001). Der aktivierte Östrogen-Rezeptor-Komplex transloziert vom Zytoplasma in den Zellkern und bindet dort mit hoher Affinität an palindromische DNA-Sequenzen der Zielgene, den sog. „Estrogen Responsive Elements“ (EREs). Bei den meisten Genen befinden sich diese in der regulatorischen Promoterregion nahe dem Transkriptionsstart. Die an die DNA gebundenen Rezeptoren treten entweder direkt oder indirekt via stabilisierender Kofaktor-Proteine mit dem Transkriptionsapparat in Kontakt. Durch die Interaktion des Rezeptordimers mit den EREs im Promoterbereich wird die Transkription der korrespondierenden Gene entweder herunter- oder heraufreguliert, was zu einer veränderten Expression der kodierten Proteine führt (Beato, 2000). Dieses aus neusynthetisierter mRNA hergestellte Protein bewirkt die genomische Antwort als Reaktion auf Östrogen-Exposition. Der Zeitrahmen zur Neusynthese einer relevanten Proteinmenge liegt im Bereich mehrerer Stunden.

Nicht-genomische Östrogenwirkung

Bereits seit über 50 Jahren ist bekannt, dass Steroidhormone Wirkungen erzielen können, die aus einer schnellen, nicht-genomischen Signaltransduktion resultieren: 1950 fand Hans Selye im Rahmen einer Studie über Steroidhormone Hinweise auf eine Wirkung, die schon wenige Minuten nach der Applikation des Hormons einsetzte und sich somit zeitlich deutlich von der genomischen Antwort unterschied (Selye, 1950). Zwei Jahrzehnte später wurde eine Reihe von Studien veröffentlicht, die schnelle Effekte des 17 β -Estradiols bei Tieren und Zellen beschrieben (Szego, 1967; Pietras, 1975). Weitere Hinweise auf schnelle Steroidhormoneffekte lieferten sehr zeitnah

einsetzende Stressantworten auf verabreichte Glukokortikoide, die Beeinflussung des Herzens als Sofort-Reaktion auf Schilddrüsenhormone oder auch vaginale Veränderungen nach der Injektion von Östrogen. Mittlerweile ist die Existenz eines an der Plasmamembran lokalisierten Östrogen-Rezeptors und die Bedeutung von zytoplasmatischen Östrogen-Effekten weitgehend anerkannt und wird durch zahlreiche überzeugende experimentelle Hinweise untermauert (Levin, 2008; Song & Santen, 2006).

Als Charakteristika der nicht-genomischen Effekte kann die Beobachtung des Wirkeintritts in einem Zeitraum von Sekunden bis Minuten wie auch die fehlende Unterdrückbarkeit durch Transkriptions- oder Translationsinhibitoren angeführt werden. Ein weiteres Kriterium, das für eine nicht-genomische Wirkweise spricht, stellt die Aktivierbarkeit durch an Rinder-Serum-Albumin gekoppeltes Östrogen (E2-BSA) dar. Diesem Konjugat ist es aufgrund des hohen Molekulargewichts des Albumins unmöglich, die Membran zu passieren und eignet sich damit für die explizite Untersuchung der membranvermittelten steroidalen Effekte (Manavathi, 2006).

Obwohl die zelluläre Antwort schneller Effekte auch die Genexpression beeinflusst, sind nicht-genomische Effekte vor allem durch ihre Einflussnahme auf die Komponenten der Signaltransduktionswege charakterisiert. Man konnte zeigen, dass 17 β -Estradiol in der Lage ist, sehr rasch die Konzentrationen intrazellulärer Second Messenger wie Calcium und cAMP zu erhöhen (Improta-Brears, 1999). Darüber hinaus wurde eine Aktivierung der Mitogen-activated Proteinkinasen (MAPK), der Adenylatcyclase (AC), der Proteinkinase C (PKC) der Phospholipase C (PLC) sowie von heterotrimeren Guanosintriphosphat-bindende Proteine (G-Proteine) beobachtet. Die endotheliale NO-Synthetase (eNOS) kann aktiviert werden, was mit einem konsekutiven NO-Anstieg einhergeht (Cato, 2002).

Bedeutende Angriffspunkte für Östrogenwirkungen, die durch einen nicht-klassischen Rezeptor vermittelt werden, stellen die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) dar, die einige Signaltransduktionswege anstoßen. Die Entdeckung eines bis dahin unbe-

kannten Östrogen-bindenden, G-Protein-gekoppelten Transmembran-Proteins mit sieben Transmembrandomänen (als GPR-30 bezeichnet) (Thomas, 2005) deutete ebenfalls in Richtung der Steroidhormoneffekte außerhalb des Nucleus. Ein Charakteristikum für die nicht rezeptorgebundenen Antworten ist die Unempfindlichkeit gegenüber Estradiol-Antagonisten (Cato, 2002), wie beispielsweise ICI182,780. Dieses gilt als das bekannteste reine Antiöstrogen. Die sog. reinen oder puren Östrogen-Rezeptor-Antagonisten differenzieren sich hauptsächlich in drei Eigenschaften von partiellen Antiöstrogenen wie z.B. Tamoxifen oder Raloxifen: Sie erreichen eine vollständige Inaktivierung des klassischen Östrogen-Rezeptors (ERs), sie inhibieren die ER-Dimerisierung und beschleunigen zusätzlich die Degradierung der ERs. Aufgrund dieser Eigenschaften erhielten sie den Beinamen Selective Estrogen Receptor Down-Regulators (SERDs). Der wohl größte Vorteil der reinen Antiöstrogene gegenüber den partiellen Antagonisten ist, dass sie an den klassischen ERs keinerlei östrogene Wirkung ausüben und so keine Rest-Rezeptorwirkung aufweisen.

Die Struktur und Herkunft der membranständigen Östrogen-Rezeptoren werden wissenschaftlich noch kontrovers diskutiert. Razandi et al. konnten in einer Studie demonstrieren, dass sowohl klassische ERs an der Plasmamembran lokalisiert sind als auch, dass membrangebundene Hormonrezeptoren existieren, die G-Protein-abhängig arbeiten und darüber hinaus in der Lage sind, viele verschiedene Signaltransduktionsfolgen wie beispielsweise die Zellproliferation zu induzieren (Razandi, 1999).

Insgesamt lassen sich die voneinander abweichenden und manchmal sogar gegensätzlichen Östrogeneffekte in den verschiedenen Gewebstypen bereits zum Teil durch die unterschiedlichen Signalwege und Rezeptortypen erklären.

1.6 Zielsetzung

Knorpelschäden belasten sowohl den einzelnen Patienten als auch die Volkswirtschaft. Multiple Therapieoptionen existieren nebeneinander. Das Tissue Engineering stellt eine erfolgsversprechende, alternative Methode dar - insbesondere für posttraumatische, fokale Defekte. Multiple Einflussfaktoren der Kultivierung der jeweiligen Zellen sind beschrieben. Die Sexualhormonsensitivität von adultem Knorpelgewebe ist bewiesen und es existieren zusätzlich Hinweise für die Beeinflussbarkeit der chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen durch 17β -Estradiol.

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese war die Existenz eines Kurzzeiteffektes von 17β -Estradiol auf die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen. Dazu sollte der MAPK-Pathway als potentiell involvierter Signalweg analysiert werden. Die Neuetaablierung eines Western Blots für das zugrundeliegende Modell musste hierzu erfolgen. Ergebnisparameter waren die histologische Untersuchung, die Ergebnisse des Western Blots sowie quantitative Syntheseleistungen von Komponenten der extrazellulären Matrix.

2 Material und Methodik

2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Gerät:	Hersteller:
Autoradiographiekassette: Hypercassette	Amersham, San Fransisco, USA
Brutschrank CO ₂ Heracell 240	Heraeus, Hanau
Falcon-Röhrchen (15/50 ml)	Becton Dickinson, Franklinlakes, USA
Fluoreszenzmikroskop	Leitz, Wetzlar
Handschuhe: Peha-soft powder free	Hartmann AG, Heidenheim
Heiz-/Rührplatte: Variomag Electro-nicrührer	H +P Labortechnik
Homogenisator: Power Gen 1000	Fisher Scientific
Kryoröhrchen	Nalge Nunc, Rochester, USA
Kryotom HM 500 OM	Microm, Berlin
Mikroskop: Laborlux 11	Leitz, Wetzlar
Mikroskopkamera DMC 2	Polaroid, Offenbach
Millipore-H ₂ O: Milli-Q	Biocel
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand, Giessen
Pipettierhilfen: Falcon Express	Becton Dickinson, Franklinlakes, USA
Pipetten, Costar Stripette (5/10/25/50 ml)	Corning, USA
Pipettensets (10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen epTips filter (10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg

Polypropylenzentrifugationsröhrchen	NeoLab, Heidelberg
Polystyrolröhrchen	Falcon, Heidelberg
Präzisionswaage BP 221 S	Sartorius, Göttingen
Reaktionscups	Eppendorf, Hamburg
Schüttler IKA-Vibrax-VXR	IKA Labortechnik, Staufen
Skalpelle	Feather, Köln
Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Roth, Karlsruhe
Waagen: EW 4200 2 NM 770-60	Kern, Balingen-Frommern Kern, Balingen-Frommern
Wasserbad: Typ 1003	GFL, Burgwedel
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten: Tissue culture plate 96 well Conical plate 96 well natural	Sarstedt, Nümbrecht Nalge Nunc, New York, USA
Zentrifugen: Biofuge fresco Multifuge 3 S-R Centrifuge 5415 R Centrifuge/Vortex Combi-Spin FVL-2400	Heraeus, Hanau Kendro, Osterode Eppendorf, Hamburg Kisker-Biotech, Steinfurt

Tabelle 2-1: Geräte und Hersteller

Allgemeine Gebrauchsreagenzien:

Reagenz:	Hersteller:
Albumin from bovine serum (BSA), Fraktion 5	Sigma-Aldrich, Seelze
Bicine	Sigma-Aldrich, Seelze
Bis-Tris	Fluka, Buchs, CH
L-Cystein	Merck, Darmstadt
D+Saccharose	Roth, Karlsruhe
Diaminobenzidin 3,3' (DAB)	Sigma-Aldrich, Seelze
1,9-Dimethylmethylenblauchlorid	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, Seelze
17 β -Estradiol	Sigma-Aldrich, Seelze
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol 100 %	Merck, Darmstadt
Ficoll	Sigma-Aldrich, Seelze
Formalinlösung 37 %	Merck, Darmstadt
Formalinlösung 37 %	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
Kobaltchlorid	Sigma-Aldrich, Seelze
Methanol, technisch	Merck, Darmstadt
MOPS	Roth, Karlsruhe

NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ O	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Seelze
Nickelchlorid	Sigma-Aldrich, Seelze
PBS Dulbecco`s	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Pepsin	Fluka, Buchs, CH
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 2	Sigma-Aldrich, Seelze
Proteaseninhibitor-Tablette: complete mini	Roche, Grenzach-Wyhlen
SDS	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Seelze
Trypsin 0,5 % EDTA	Gibco, Karlsruhe

Tabelle 2-2: Gebrauchsreagenzien und Hersteller

Histologie:

Material:	Hersteller:
<i>Primär-Antikörper:</i> Monocl. mouse anti Coll II IgG1	Calbiochem, Darmstadt
<i>Sekundär-Antikörper:</i> Biotin-SP-conjugated goat anti mouse IgG	Dianova, Hamburg
DePeX	Serva, Heidelberg
Gelatine	Sigma-Aldrich, Seelze

Objektträger: Star Frost (ca. 76 x 26 mm)	Knittel, Braunschweig
Propanol	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

Tabelle 2-3: Histologiematerialien und Hersteller

Zellkulturmedien, Mediumzusätze und Seren:

Reagenz:	Hersteller:
Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich, Seelze
Dexamethason > 97 %	Sigma-Aldrich, Seelze
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (4,5 g/l)	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low Glucose (1 g/l)	Gibco, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum	Gibco, Karlsruhe
Hepes buffer	Gibco, Karlsruhe
ITS+3	Sigma-Aldrich, Seelze
PenStrep (Penicillin/Streptomycin)	Gibco, Karlsruhe
Pyruvat	Gibco, Karlsruhe
Transforming Growth Factor- β 1 (Lyophilisat)	R&D Systems, Wiesbaden

Tabelle 2-4: Zellkulturmedien, Mediumzusätze und Seren

Kits und Assays:

Kit/Assay:	Hersteller:
ABC-Kit, Vectastain	Vector laboratories Inc., Burlingame, USA

Native Type II Kollagen Detection Kit <i>Lagerung bei -20 °C</i>	Chondrex, Richmond, USA
DC Protein Assay Reagents Package <i>Lagerung bei Raumtemperatur</i>	BioRad, Hercules, USA
Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent and Kits <i>Lagerung bei -20 °C</i>	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 2-5: Kits und Assays

Western Blot:

Material:	Hersteller:
Blot-Kammer: TE 22 Tank Transfer Unit	Hoefer, San Fransisco, USA
Elektrophorese-Einheit: SE 260 mini-vertical gel electrophoresis unit	Hoefer, San Fransisco, USA
Elektrophorese-Gerät: Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
Entwickler GV 60, Part 1 & 2	Chemie, Dietzenbach
Entwicklungsmaschine: Curix 60AGFA	Siemens AG, Erlangen
Fixierer GV 60	Chemie, Dietzenbach
Frischhaltefolie Saran	Felzmann, Linz, Österreich
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel, 1x12 well	Invitrogen, Karlsruhe

NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Sample Reduction Agent (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Transfer Puffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Precision Plus Protein Standards, All Blue	Biorad, München
Transferfolie Immobilon™ P, PVDF, (Porengröße 0,45µm)	Millipore, Roth, Bedford, UK
Starting Block TBS, Blocking buffer	Pierce, Rockford, USA
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Pierce, Rockford, USA
Tween 20 for electrophoresis	Sigma-Aldrich, Seelze
Western Blot Filter Papier	Pierce, Rockford, USA

Tabelle 2-6. Western Blot-Materialien und Hersteller

Primär-Antikörper:

Protein	Hersteller	Verdünnung	Wirt/ Klonalität	MW
ERK 1/2	Upstate Biotechnology	1:1000	rabbit	ERK1: 42 kDa ERK2: 44 kDa
Phospho-ERK 1/2	Upstate Biotechnology	1:1000	rabbit	P-ERK1: 42 kDa P-ERK2: 44 kDa
p38	Cell Signaling Technology	1:1000	rabbit	38 kDa
Phospho-p38	Cell Signaling Technology	1:1000	rabbit	38 kDa

<i>JNK/SAPK</i>	Cell Signaling Technology	1:1000	rabbit/ polyclonal	JNK1: 46 kDa JNK2/3: 54 kDa
<i>Phospho-JNK/SAPK</i>	Cell Signaling Technology	1:1000	rabbit/ polyclonal	P-JNK1: 46 kDa P-JNK2/3: 54 kDa
<i>β-Aktin</i>	Cell Signaling Technology	1:1000	rabbit	45 kDa
<i>ER-alpha</i>	Pierce Thermo Scientific	1:1000	rabbit	67 kDa
<i>ER-beta</i>	Pierce Thermo Scientific	1:1000	rabbit/ polyclonal	55 kDa

Tabelle 2-7: Primär-Antikörper Western Blot

Lagerung von ERK und Phospho-ERK bei -80 °C

Lagerung aller übrigen Primär-AK bei -20 °C nach Angaben des Herstellers.

Sekundär-Antikörper:

Protein	Hersteller	Verdünnung	Wirt/ Klonalität
Goat anti-rabbit-IgG-HRP-conjugated	Pierce, Rockford, USA	1:1000 (Konzentration: 10 µl/ml)	goat (anti rabbit)/ IgG

Tabelle 2-8: Sekundär-Antikörper Western Blot

Lagerung des Sekundär-AK bei 4 °C nach Angaben des Herstellers.

2.2 Methodik

Ziel der experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit war es zunächst, die Wirkung des weiblichen Sexualhormons 17β -Estradiol auf sich in der chondrogenen Differenzierungsphase befindliche humane mesenchymale Stammzellen zu konkretisieren. Dazu beschäftigte man sich nach Östrogenstimulation der Zellen mit deren ECM-Syntheseaktivität, indem man die Produktion der bedeutenden knorpeltypischen Strukturmoleküle Kollagen vom Typ II und der Glykosaminoglykane sowie den DNA-Gehalt quantifizierte.

Darüber hinaus wurde im zweiten Teil der Arbeit die Einflussnahme des 17β -Estradiols auf die an einer Vielzahl von Zellprozessen mitwirkenden MAP-Kinasen-Signalwege während der chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen untersucht. Dazu wurde nach Etablierung der Western Blot-Technik die MAPK-Aktivierung in Abhängigkeit verschiedener Estradiol-Konzentrationen und –Inkubationszeiten sichtbar gemacht.

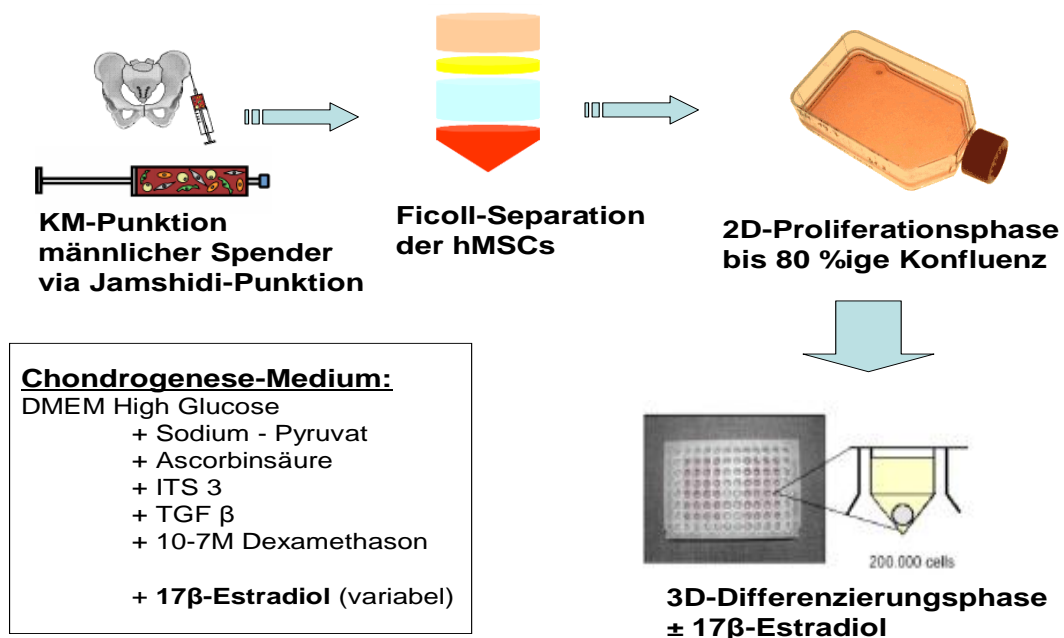


Abbildung 2-1: Schematisch dargestellter grundsätzlicher Versuchsablauf in Vorbereitung auf die E2-Stimulationsexperimente

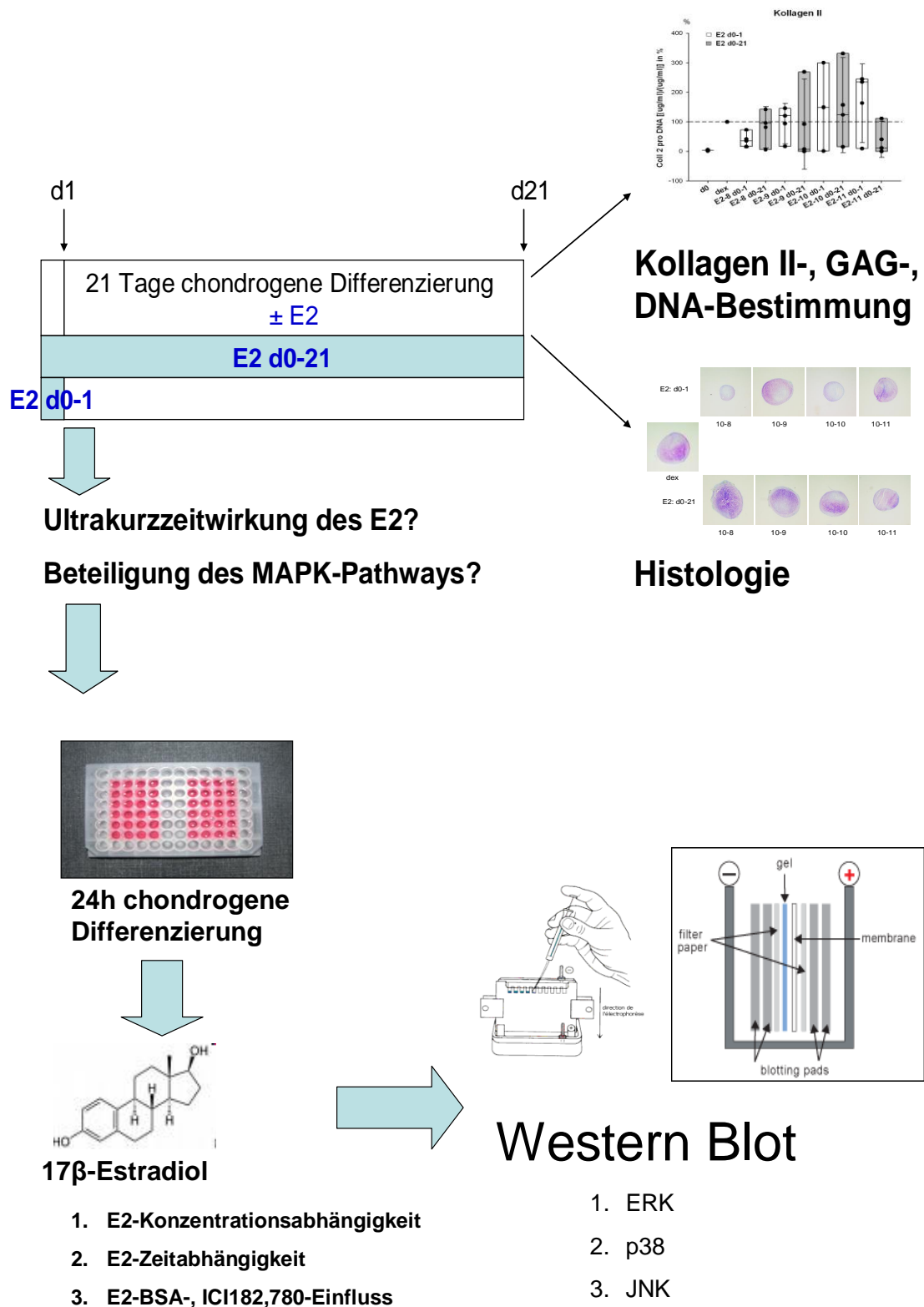


Abbildung 2-2: Schematisch dargestellter Versuchsablauf der Untersuchung des 17β-Estradiol-Einflusses auf hMSCs während der chondrogenen Differenzierung

Versuchsablauf

Sowohl für die 1- bzw. 21-tägigen Östrogen-Stimulationsexperimente als auch für die Untersuchung der MAPK-Aktivierung mittels Western Blot folgte auf die Gewinnung der Zellen aus menschlichem Knochenmark eine ca. zweiwöchige in vitro-Proliferierungsphase. Nach Erreichen der 80 %igen Konfluenz wurden die Zellen zunächst in die 3D-Pellet-Kultur (200 000 Zellen pro Aggregat) überführt und anschließend je nach Versuchsgruppe mit 17 β -Estradiol versetzt. Die Zellen, deren Kollagen Typ II-, GAG- sowie DNA-Gehalt bestimmt werden sollte, wurden anschließend einer 21 Tage dauernden Differenzierung mit entweder eintägiger oder 21-tägiger 17 β -Estradiol-Inkubationszeit mit unterschiedlichen E2-Konzentrationen (von 10⁻⁸ bis 10⁻¹¹ M) zugeführt. Für die MAPK-Experimente wurden eine kürzere E2-Stimulationsdauer im Bereich von 1 – 240 min sowie eine Konzentrationsspanne von 10⁻⁷ bis 10⁻¹¹ M gewählt.

Die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu knorpel-ähnlichem Gewebe wurde in dieser Arbeit durch Kultur in chondrogenem Medium erzielt. Dieses besteht aus TGF- β 1, Dexamethason, Ascorbinsäure, ITS+3 und Natriumpyruvat in serumfreien DMEM High Glucose Medium.

Kollagen II-, GAG- und DNA-Bestimmung sowie histologische Auswertung nach 1 Tag bzw. 21 Tagen E2

Der Versuchsplan beinhaltete neun Gruppen, von denen eine (Gruppe 1) als Kontrollgruppe fungierte. Diese wurde lediglich mit Dexamethason enthaltendem Chondrogenese-Medium versetzt. Dexamethason ist ein synthetisches Steroid, welches die chondrogene Differenzierung in humanen mesenchymalen Stammzellen induziert (Heng, 2004). Weitere 4 Gruppen (Gruppe 2 - 5) wurden für einen Tag mit 17 β -Estradiol der Konzentrationen 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰ und 10⁻¹¹ M inkubiert. Die restlichen 20 Tage versah man diese 4 Gruppen mit dem gleichen Medium wie die Kontrollgruppe.

Die letzten 4 Gruppen (Gruppe 6 – 9) erhielten 21 Tage lang Differenzierungsmedium mit Östrogenzusatz in einer Konzentrationsbreite von ebenfalls 10^{-8} bis 10^{-11} M.

Gruppen-Nummer	Dex. 10^{-7} M-haltiges Chondrogenesemedium ohne E2-Zusatz	Konzentration der E2-Zusätze	Dauer der E2-Zusätze
1	d0-21	-	-
2	d1-21	10^{-8} M	d0-1
3	d1-21	10^{-9} M	d0-1
4	d1-21	10^{-10} M	d0-1
5	d1-21	10^{-11} M	d0-1
6	-	10^{-8} M	d0-21
7	-	10^{-9} M	d0-21
8	-	10^{-10} M	d0-21
9	-	10^{-11} M	d0-21

Tabelle 2-9: Gruppeneinteilung während 21tägiger Chondrogenese zur anschließenden Kollagen II-, GAG- und DNA-Bestimmung sowie zu histologischen Auswertung

Bereits während und am Ende der beschriebenen Differenzierungsphase wurden auch Aggregate für die histologische Auswertung entnommen, fixiert und gefärbt.

Nach Ablauf der dreiwöchigen Chondrogenese phase wurden die Zellen dem Verdau zugeführt um die zu detektierenden Struktur molecule freizulegen. Anschließend führte man zum Teil mit Hilfe handelsüblicher Kits die Kollagen Typ II-, GAG- und DNA-Quantifizierung durch.

2.2.1 Allgemeine Versuchsvoraussetzungen

Gewinnung humaner mesenchymaler Stammzellen & Zellkultur

Nach positivem Votum der Ethikkommission der Universitätsklinik Regensburg wurde im unfallchirurgischen Operationssaal Knochenmark intraoperativ gewonnen. Via Jamshidi-Punktion wurde mittels einer Aspirationskanüle aus dem Beckenkamm Knochenmark abpunktiert. Dabei handelte es sich um Beckenkammspanentnahmen, die zumeist zur Spondylodese bei Wirbelsäulenverletzungen von Nöten waren. Die schriftliche Einwilligung jedes Patienten lag vor.

Alle für diese Arbeit verwendeten Zellen stammten ausschließlich von männlichen Patienten. Bei der histologischen Auswertung und der Kollagen Typ II-, GAG- und DNA-Quantifizierung wurde mit den Stammzellen dreier Knochenmarkspendern gearbeitet. Für die MAPK-Untersuchung mittels Western Blot verwendete man Zellen von 7 Spendern. Das Alter der Spender lag im Bereich von 18 bis 51 Jahren.



Abbildung 2-3: Intraoperative Jamshidi-Punktion des Beckenkamms

Aufreinigung über Ficoll-Gradienten

Am Tag der Abnahme wurde das Knochenmarkaspirat mit Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (low glucose) supplementiert. Bei der Aufreinigung mittels Ficoll-Separation (Lange 2005) wurden die mononukleären Zellen von den anderen Zelltypen (Erythrozyten und Granulozyten) abgetrennt. Dazu wurde Ficoll langsam mit dem Knochenmarks-Medium-Gemisch überschichtet und 30 min bei 800 g nach Angaben des Herstellers zentrifugiert. Das überständige Medium wurde abgesaugt und die darunter liegende Phase der mononukleären Zellen vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und gesammelt. Anschließend wurde daraus die Zellzahl mittels lichtmikroskopischer Auszählung bestimmt. Die aufgereinigten mesenchymalen Stammzellen wurden in speziellen Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff (-190 °C) konserviert.

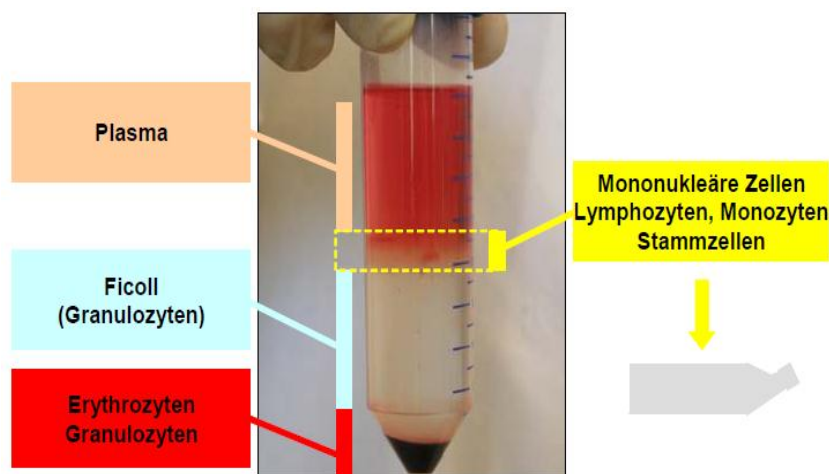


Abbildung 2-4: Auftrennung der Zellsuspension über den Ficoll-Gradienten

Anlegen der zweidimensionalen Zellkulturen zur Proliferation

Alle Arbeitsschritte wurden in der Sterilbank ausgeführt.

Zur Kultivierung der Zellen wurden diese aufgetaut, in frisches MSC-Medium aufgenommen und im Anschluss daran 10 min lang bei 216 g zentrifugiert. Man verwarf den

Überstand und übernahm die Zellen in frisches Medium. Dann wurden die Zellen in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Im Anschluss an die Zellzählung wurde je nach Zellzahl Medium in die Zellkulturflaschen vorpipettiert und im Folgenden die Zellsuspension so aufgeteilt, dass sich in jeder Flasche 200.000 Zellen befanden. Durch Schwenken der Zellkulturflaschen wurde das homogene Anwachsen des Zellteppichs am Flaschenboden sichergestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank der Firma Heraeus bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Das Medium wurde mindestens zweimal pro Woche gewechselt bis die adhärennten Zellen eine 80 %ige Konfluenz erreicht hatten. Für einen Mediumwechsel wurde das alte Medium abgesaugt und mittels einer sterilen Einmalpipette durch frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Medium ersetzt.

Für mesenchymale Stammzellkulturen (MSC-Medium)/Proliferationsmedium:

Low Glucose (1 g/l) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (phenolrotfrei)

10 % FCS nicht hitzeinaktiviert

1 % HEPES Puffer

1 % PenStrep

Anlegen der dreidimensionalen Zellkulturen zur Differenzierung

Nach der Proliferation der Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 % erfolgte eine Überführung der Zellen in dreidimensionale Zellaggregate. Zu diesem Zweck wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellkultur in zwei Durchgängen mit im Wasserbad erwärmter PBS-Lösung (jeweils ca. 5 ml pro Zellkulturflasche) gespült um das alte Medium vollständig zu entfernen. Im Anschluss daran wurden die Zellen etwa 3 – 5 min mit 3 ml 0,5 % Trypsin/EDTA pro Flask inkubiert und während dieser Zeitspanne das vollständige Ablösen der Zellen vom Flaschenboden unter dem Mikroskop kontrolliert. Bei hartnäckiger Adhärenz konnte der Ablöseprozess durch manuelles Klopfen gegen die Seitenwände der Zellkulturflaschen verstärkt werden. Danach wurde durch

Zugabe von 10 ml des Low Glucose-Mediums die Wirksamkeit des Trypsins herabgesetzt, die Zellsuspension in 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt (der Inhalt von jeweils 4 Zellkulturflaschen in ein Falcon-Tube) und 10 min lang bei 216 g (Temperatur: 25 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die pelletierten Zellen wurden in High Glucose-Medium resuspendiert. Dabei wurde so vorgegangen, dass man 5 ml des Mediums in das erste Falcon-Röhrchen pipettierte und durch mehrmaliges Aufziehen in die 10 ml-Einmal-Pipette die Zellen vereinzelt und mischte. Dann überführte man die Zellsuspension vollständig in das nächste mit einem Zellpellet versehene Falcon-Tube und wiederholte die beschriebene Prozedur. Auf diese Weise wurden nacheinander die zuvor pelletierten Zellen aller 50 ml-Falcon-Röhrchen in einem Volumen von 5 ml High Glucose-Medium suspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden jeweils 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl 0,4 %iger Trypanblau-Lösung gemischt und wiederum 20 µl dieser 1:1-verdünnten Lösung in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Alle 4 Quadranten der Kammer wurden ausgezählt und der Mittelwert pro Quadrant ermittelt. Neben der Ermittlung der Zellzahl erlaubte dieser Schritt die Beurteilung der Zellen hinsichtlich Vitalität, da Trypanblau von den Membranen lebender Zellen abgehalten wird, wohingegen tote Zellen (z.B. durch Überkonfluenz oder verlängerte Trypsinwirkung) den Farbstoff durch ihre porösen Membranen eindringen lassen und so blau angefärbt werden. Als nächstes wurde die Zellsuspension mit Medium auf ein Volumen von 20 ml aufgefüllt, erneut für 10 min bei 216 g zentrifugiert und abschließend der Überstand verworfen. Pro Zellaggregat benötigte man 200.000 Zellen, die in 350 µl Differenzierungsmedium gelöst sein sollten. Je nach vorhandener Gesamt-Zellzahl ergab sich die Anzahl der möglichen Aggregate bzw. der zu befüllenden Vertiefungen („wells“) und daraus wiederum das benötigte Volumen an Differenzierungsmedium. In diesem errechneten Volumen wurden die Zellen in Suspension gebracht und durch das wiederholte Aufziehen in eine Multipette gemischt. Im Anschluss daran verteilte man jeweils 350 µl pro des Zell-Differenzierungsmedium-Gemisches je well nach Versuchsanordnung entweder mit oder ohne E2-Zusatz auf

eine 96 well-Zellkulturplatte. Nach fünfminütiger Zentrifugation der Platte bei 863 g und 25 °C beließ man die Platte unter oben genannten Bedingungen im Brutschrank.

Differenzierungs-/Chondrogenese-Medium:

High Glucose (4,5 g/l) DMEM (phenolrotfrei)

1 % Dexamethason

1 % Natrium-Pyruvat

1 % ITS+3 (Insulin, Transferrin, Selenium)

1 % Ascorbinsäure (20 mM)

0,5 % TGF- β 1 recombinant

Lagerung bei 4 °C

Ansetzen der Adhäsions- und Wachstumsfaktoren:

Ascorbinsäure (20mM):

0,1024 g Ascorbinsäure

20 ml Tyrodes-Lösung (s. unten)

Sterile Filtration

Lagerung bei -20 °C

Tyrodes-Lösung:

9,73 g Tyrodes-Salz

0,2 g NaHCO₃

10 ml PenStrep

990 ml H₂O

Dexamethason-Stocklösung (1 mM):

0,00392 g Dexamethason

10 ml 100 % Ethanol

Lagerung bei -20 °C

Dexamethason-Gebrauchslösung (10 µM):

200 µl Stocklösung

19,8 ml DMEM Low Glucose

Sterile Filtration, Lagerung bei -20 °C

TGF-β1 recombinant:

12,5 mg BSA

0,5 ml 0,1 N HCl

12 ml H₂O

1 Cup TGF-β1-Lyophilisat

Lagerung bei -80 °C

2.2.2 Versuch über 21tägigen Differenzierungszeitraum: Kollagen II-, GAG- sowie DNA-Bestimmung und Histologie

Kollagen-Typ-II-ELISA

Verdau (Tag 1-5):

Das von den Zellen neu hergestellte Kollagen wird in die extrazelluläre Matrix eingelagert und verbleibt so in Fibrillenform. Es befindet sich nur ein sehr kleiner Teil lösliches, monomerisches Kollagen im Zellkulturmedium. Aus diesem Grund musste, um die Kollagenproduktion der Zellen mit Hilfe des „Native Type II Kollagen Detection Kits“ bestimmen zu können, das Kollagen zunächst unter sauren Bedingungen mit Pepsin und später unter neutralen Bedingungen mit Pankreas-Elastase verdaut werden um Kollagen-Polymere in –Monomere zu konvertieren.

Tag 1: Die bei -80 °C eingefrorenen Proben wurden in jeweils 200 µl 0,5 M NaCl beinhaltende Essigsäure resuspendiert, um ein saures Milieu bereitzustellen. Anschließend wurde je Probe 25 µl von in 0,05 M Essigsäure gelösten Pepsins (Konzentration: 10 mg/ml) hinzugefügt und die Röhrchen über Nacht bei 4° C auf einem Rotator belassen.

Tag 2 und 3: Am darauf folgenden Tag wurden die Proben kurz abzentrifugiert und dann homogenisiert. Unmittelbar nach der Homogenisierung wurde der Verdauungsschritt von Tag 1 wiederholt (d.h. zu jeder Probe 200 µl 0,5 M NaCl beihaltende Essigsäure und 25 µl von in 0,05 M Essigsäure gelösten Pepsin (Konzentration: 10 mg/ml)). Nun kamen die Proben diesmal für 2 Tage bei 4° C auf den Rotator.

Tag 4: Nach Ablauf dieser Zeit wurden die angedauten Zellaggregatslösungen nach kurzer Abzentrifugation mit jeweils 50 µl TBS (10 x) versetzt und durch Zugabe von 2 N NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Als nächstes wurde aus Pankreas-Elastase und TBS (1x) eine 1 mg/ml konzentrierte Mischung produziert und 50 µl davon jeder Probe beigelegt. Über Nacht verblieben die Proben bei 4° C auf dem Rotator.

Tag 5: Die Proben wurden vom Rotator genommen und entweder bei -80 °C eingefroren oder es wurde sofort mit dem Kollagen-Typ-II-ELISA begonnen.

TBS (10x):

1,0 M Tris

2,0 M NaCl

50 mM CaCl₂

pH 7,8 – 8,0

Kollagen Assay:

Der Kollagen-Typ-II-ELISA wurde nach der indirekten Methode durchgeführt. Zunächst wurde ein spezifischer Primärantikörper an eine feste Phase (Mikrotiter-Platte) adsorbiert. Dieser sog. Capture Antibody bindet das zu detektierende Antigen (Kollagen II) aus den Zellüberständen. Anschließend erfolgte die Zugabe des mit Biotin dekorierten Sekundärantikörpers (sog. Detection Antibody), der ebenfalls für Kollagen II spezifisch ist, jedoch ein anderes Epitop erkennt. Aufgrund dieses Aufeinanderfolgens von Primärantikörper – Antigen – Sekundärantikörper wird diese hier beschriebene indirekte ELISA-Methode auch als Sandwich-Prinzip bezeichnet. Zur Signalverstärkung

bindet mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes Streptavidin mit sehr hoher Affinität an Biotin. Der letzte Schritt bestand aus einer enzymatisch katalysierten Farbreaktion. Das Chromogen OPD verändert hierbei seine Farbe in den Bereich des Orangen. Diese Reaktion wurde mit Schwefelsäure abgestoppt und anschließend in einem Mikrotiter-Platten-Lesegerät spektrophotometrisch quantifiziert.

Für diese Arbeit wurde der „Native Type II Collagen Detection Kit“ der Fa. Chondrex nach Herstellerangaben verwendet. Um die Adsorption des Primärantikörpers an die Platte zu erreichen, wurden 100 µl einer nach Herstellerangaben gemischten 1:100 Verdünnung aus Capture Antibody (0,1 ml) und Capture Antibody Dilution Buffer (10 ml) in jede Vertiefung einer 96 well Platte pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde nach Ausklopfen der Lösung die Platte mindestens sechsmal mit Waschpuffer(1x) gewaschen. Als nächstes erfolgte die Zugabe der Standards und der Proben. Dazu wurde der Kollagen II-Standard der Konzentration 0,2 µg/ml jeweils 1:2 bis auf eine Konzentration von 0,003125 µg/ml mit Standard Dilution Buffer verdünnt. Da eine Dreifachbestimmung angestrebt wurde, wurden nun jeweils drei wells mit 100 µl sowohl der Standardverdünnungen als auch der Proben befüllt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf dieser zwei Stunden wiederholte sich die sechsfache Waschprozedur mit vorangehendem Ausklopfen der Platte. Nun wurden 100 µl/well des 1:200 verdünnten Detection Antibodys in die Platten-Vertiefungen pipettiert und wiederum zwei Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur abgewartet. Nach erneutem gründlichen Waschen fügte man jedem well 100 µl einer Streptavidin-Peroxidase-Lösung hinzu. Die darauf folgende Inkubation dauerte eine Stunde und erfolgte bei Raumtemperatur. Anschließend beließ man nach mindestens sechs Waschgängen den Waschpuffer vorerst in der Platte um dieselbe vor dem Austrocknen zu bewahren. Der Grund hierfür ist in der Instabilität der OPD-Urea-H₂O₂-Lösung, die erst kurz vor Gebrauch aus Urea-H₂O₂-Pulver, OPD-Pulver und 20 ml raumtemperiertem, destilliertem Wasser hergestellt werden sollte. Nach Anmischung dieser Lösung sollten davon jeweils 100 µl/well innerhalb 15 min auf die gewaschene Platte aufgebracht werden. Dann ließ man die Lösung 30 min lang einwirken. Die

ablaufende Farbreaktion wurde mit 50 µl/well 2 N Schwefelsäure abgestoppt und die Platte sofort bei 490 nm Absorption photometrisch vermessen.

GAG-Assay

Zur Bestimmung des Glycosaminoglycangehalts als Maß für den Proteoglykangehalt wurde Papain-Puffer zum Matrixverdau angesetzt. Um eine Standardkurve zur Kalibrierung erstellen zu können, wurde vorab eine Stammlösung aus Chondroitinsulfat-A und Papain-Puffer hergestellt. In diesem Puffer digestierte Papain das Chondroitinsulfat-A wie es auch mit den in den Proben vorhandenen Glykosaminoglykane geschehen sollte. Aus der beschriebenen Stammlösung ergaben sich durch eine 1:1-Verdünnungsreihe mit Papain-Puffer sieben Standards mit linear absteigenden Konzentrationen von 80 µg/ml bis 1,25 µg/ml. Nun erfolgt ein Dreifachansatz von 50 µl Probe bzw. Standard pro well einer 96 well-Mikrotiter-Platte. Im Anschluss daran wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 200 µl/well DMMB-Reagenzlösung gestartet. Die Messung wurde von einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt. Eventuell notwendige Verdünnungen der Proben wurden mit Papain-Puffer erstellt.

DMMB-Reagenzlösung:

27,2 mg 1,9-Dimethylmethylenblauchlorid-Lösung

5,168 g Glycin

4,03 g NaCl

32,3 ml 1M HCl

1 l H₂O

DNA-Quantifizierung

Zur Quantifizierung des DNA-Gehalts wurde das „Quant-iT PicoGreen dsDNA Kit“ der Firma Invitrogen verwendet. Hierbei handelt es sich um eine fluorimetrische Methode

der DNA-Quantifizierung: Der Farbstoff PicoGreen bindet an doppelsträngige DNA und fluoresziert nach Anregung bei 502 nm mit maximaler Emission bei 523 nm. Im PicoGreen-Assay wurde – an das verwendete Gerät adaptiert – bei 480 nm angeregt und die Emission bei 520 nm registriert (Brunner, 2002).

Zunächst wurden die Proben 1:10 mit im Kit enthaltenen TE-Puffer (1x) (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) verdünnt und davon jeweils 100 µl pro well auf die Mikrotiterplatte (96 well) aufgetragen. Anschließend versetzte man die verdünnten Proben mit dem gleichen Volumen (100 µl) der Farbstofflösung. Hierzu wurde eine 1:200 Verdünnung der kommerziell erhältlichen Stammlösung (Quant-iT PicoGreen dsDNA reagent) in TE-Puffer vor Licht geschützt hergestellt, sofort aufgetragen und ausgelesen. Zur Kalibration wurde aufgereinigte Bacteriophagen-Lamda-DNA in kontinuierlichen 1:2-Verdünnungen verwendet. Der Standardkurven-Konzentrationsbereich spannte sich von 1 µg/ml bis hinzu 31,25 ng/ml dsDNA.

Alle Messwerte wurden dreifach bestimmt.

Histologische Auswertung und Färbungen

Gewebefixierung:

Die Aggregate wurden mit einem sterilen Löffel der Zellkultur entnommen und fixiert: Als Fixierlösung diente das Formalin-haltige Standard-Fixans, das zunächst für 20 min mit Glutaraldehyd versetzt einwirkte und nach Ablauf dieser Zeit von Standard-Fixans ohne Glutaraldehyd für eine weitere Inkubationszeit von 40 min abgelöst wurde. Nach Absaugung der Fixierlösung erfolgte das Auswaschen derselbigen mit 0,1 M Phosphatpuffer, bevor die Proben in Saccharoselösungen aufsteigender Konzentration (10 %, 20 %, 30 % in 0.1 M Phosphatpuffer) für jeweils 15 min überführt wurden. Die 30 %igen Saccharoselösung wurde nach kurzer Einwirkzeit mit dem gleichen Volumen an Tissue Tec bedeckt und über Nacht im Kühlschrank belassen.

Einbettung:

Am nächsten Tag füllte man ein Gießschälchen mit Tissue Tec und bettete die Zellaggregate vorsichtig darin ein. Die Aggregate wurden dabei so angeordnet, dass das zu schneidende Material am Boden der Gießhalterung zu liegen kam. Zur Orientierung am Block wurde ein kleines Stück Kontrollgewebe in die rechte untere Ecke eingebettet. Anschließend folgte das Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Nach Aushärtung des Tissue Tecs wurde der Block aus der Gießform geschlagen. Am Kryotom wurden Gefrierschnitte der Dicke 10-14 µm angefertigt und sogleich auf mit Gelatine beschichtete, fett- und staubfreie Objektträger aufgebracht.

Kollagen-Typ-II-Immunhistochemie:

Zunächst wurden die Schnitte kurz in H₂O rehydriert, um gleich im Anschluss die unspezifischen endogenen Peroxidasen durch einen Blocking-Puffer abzusättigen (Inkubationszeit: 15 min). Als nächstes wurden die Präparate für 3 x 5 min in Triton-freiem Waschpuffer gespült. Nun folgte der 15-minütige Andauschritt mit 1 mg/ml konzentrierter Pepsinlösung in McIlvaine-Puffer, um das Kollagen II freizulegen. Nach einem weiteren dreifachen Waschdurchgang wurden unspezifische Bindungsstellen durch 60-minütige Inkubation in einem Kälber- und Ziegenserum-enthaltendem Blocking-Puffer abgesättigt. Anschließend wiederholte man den Waschschrift und ließ den Primär-Antikörper (1:1000 in Blocking-Puffer verdünnt) über Nacht in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur einwirken. Am folgenden Tag wurde der primäre Antikörper durch gründliches Waschen von den Präparaten eliminiert und die Antigen-Antikörper-Reaktion durch 60-minütiges Inkubieren wiederum in der feuchten Kammer mit einem biotinylierten 1:1000 in Blocking-Puffer verdünntem Sekundär-Antikörper verstärkt. Nachdem man auch den sekundären Antikörper in einer erneuten Waschprozedur entfernt hatte, folgte die Inkubation mit Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC-Kit) für 60 - 90 min und darauf folgendes Auswaschen des ABC-Komplexes. Die Entwicklung erfolgte mit DAB-Arbeitslösung, welche kurz vor ihrem

Einsatz mit H_2O_2 aktiviert worden war. Nach einer Entwicklungszeit von bis zu 5 min, wurde die DAB-Lösung abgegossen und die Schnitte kurz in H_2O gespült. Die Dehydrierung der Präparate erfolgt in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 90 %, 2 x 96 %, 2 x 100 % Propanol für jeweils ca. 5 min) und in Xylol für 2 x 5 min. Aus Xylol heraus wurden die Schnitte mit DePeX eingedeckelt.

Bei jeder Färbung wurde zur Kontrolle ein Schnitt ohne Primär-Antikörper mitgeführt.

Peroxidasen-Blockierlösung:

10 % Methanol

3 % H_2O_2

PBS

Waschpuffer für Immunhistochemie:

0,2 M Tris (24,228 g Tris, 1000 ml Aqua dest., mit HCl auf pH 7,0 einstellen)

0,8 % NaCl

Aqua dest.

pH 7,0, Lagerung bei Raumtemperatur

McIlvaine-Puffer:

67,8 ml 0,1 M Zitronensäure

32,2 ml 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat

pH 3,6

Blocking-Puffer:

10 % FCS

10 % Ziegenserum

Waschpuffer (s.o.)

DAB-Stammlösung (10x):

0,5 % 3,3'-Diaminobenzidin

0,1 % BSA

Aqua dest.

DAB-Arbeitslösung:

200 µl DAB/BSA

1800 µl 0,1 M m-PBS-Puffer

80 µl Ni/Co

mit 6 µl H₂O₂ (6 %) (direkt vor Verwendung) aktivieren

m-PBS-Puffer (10 x konzentrierte Stammlösung, 1 M):

47,2 g K₂HPO₄

6,6 g NaH₂PO₄

36 g NaCl

Mit Aqua dest. auf 500 g auffüllen

pH zwischen 7,0 und 7,4

Dimethylmethylenblau-Färbung:

Zum qualitativen Nachweis von sulfatierten Glykosaminoglykanen wurde eine DMMB-Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Präparate nach kurzer Rehydrierung in 0,1 %ige DMMB-Lösung für 5 min angefärbt. Anschließend wurde die überschüssige Farbe in Leitungswasser abgespült. Die dann folgende aufsteigende Alkoholreihe (2 x 90 %, 2 x 96 %, 2 x 100 % Propanol für jeweils ca. 5 min, abschließend für 2 x 5 min in Xylol) diente zur Entwässerung der Schnitte. Nun wurde die Präparate mit einem Tropfen DePeX beträufelt und ein Deckglas luftblasenfrei aufgebracht.

2.2.3 MAPK-Stimulationsexperimente mittels Western Blot-Technik

17 β -Estradiol-Zusätze

Die im Folgenden beschriebenen Schritte erfolgten bis auf die Stimulation mit 17 β -Estradiol alle auf Eis oder unter Kühlung (5 °C) um einen sofortigen Stopp der Stoffwechselaktivitäten zu erreichen und durch Ausschalten von zusätzlichem Stress die MAP-Kinasen nicht unabhängig von der Hormonzugabe zu aktivieren.

Nach 24 h Differenzierung wurde das Differenzierungsmedium vorsichtig abgesaugt. Die Zellaggregate wurden nun mit 17 β -Estradiol (E2), das mit High Glucose-Medium (ohne Zusätze) auf Konzentrationen zwischen 10^{-7} M und 10^{-11} M verdünnt worden war, inkubiert. Die angestrebten Konzentrationen erreichte man in einer Verdünnungsreihe einer Östrogen-Stammlösung. Sofort nach Ablauf der vorgesehenen Inkubationszeit (1 bis 240 min) entnahm man die Zellaggregate entweder mit einem Spatel oder mit einer 1000 μ l-Pipette und überführte sie in unten abgerundete Zentrifugations-Cups. Anschließend wurden die Aggregate zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen um so das evtl. noch vorhandene Östrogen vollständig zu eliminieren und eine etwaige Restwirkung zu minimieren. Zwischen und nach den beiden Waschschritten wurde der Überstand mittels einer auf eine Spritze aufgebrachten Kanüle abgezogen. Als nächstes wurde pro Cup jeweils 400 μ l eiskalter RIPA-Lyse-Puffer hinzugefügt und die Zellaggregate wurden homogenisiert. Der hier verwendete Homogenisator „Homogenizer Power Gen“ zerkleinert Gewebe durch die Wechselwirkung zwischen einem beweglichen (Rotor) und einem stehenden (Stator) Teil. Danach ließ man den RIPA-Lyse-Puffer 20 min auf die homogenisierten Zellen einwirken. Auf diesen Inkubationsschritt folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei einer Temperatur von 5 °C. Der Überstand wurde nun in Eppendorf-Cups überführt und bei -80 °C gelagert. Das Pellet wurde verworfen. Ein Aliquot pro Probe wurde für die Bestimmung des Proteingehalts verwendet.

RIPA-Lyse-Puffer (engl. radio-immuno-precipitation-assay):

Zunächst wurde Tris in Millipore-Wasser gelöst und mit rauchender Salzsäure (HCl) auf pH 7,4 titriert, anschließend wurden die übrigen Reagenzien beigelegt.

50 mM TrisHCl (pH 7,4)

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1 % Triton X-100

1 % Natriumdeoxycholat

0,1 % SDS

Lagerung nur für wenige Tage bei 4 °C möglich

Erst zeitnah vor dem Einsatz des RIPA-Lyse-Puffers wurde jeweils eine Tablette Proteaseninhibitor sowie 10 µl Phosphatase-Inhibitor-Cocktails 2 pro 10 ml RIPA-Puffer hinzugegeben und durch gründliches Vortexen in Lösung gebracht.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die quantitative Bestimmung der Gesamtproteinmenge einer Lösung wurde unter Verwendung eines kolorimetrischen Assays (DC Protein Assay Reagents Package) der Firma BioRad (München) nach der modifizierten Methode von Lowry (Lowry, 1951) durchgeführt. Dabei bilden sich durch Zugabe einer alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung (Reagenz A des verwendeten Kits) zu den Proteinlysaten Kupfer-Peptid-Komplexe aus. Das zugesetzte Tartrat hat die Aufgabe, Cu^{2+} in Komplexbindungen zu binden, da dieses sonst als $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ausfallen würde. Die beschriebenen Kupfer-Peptid-Komplexe reduzieren nun Folin-Reagenz (Phosphormolybdat) (enthalten in Reagenz B) zu Molybdänblau. Die photometrisch erfassbare Farbentwicklung ist vor allem den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan zuzuschreiben. Die sich ergebende Farbintensität ist proportional der Anzahl der Peptidbindungen und von der übrigen chemischen Zusammensetzung des Proteins unabhängig. Darüber hinaus eignet sich diese Methode auch für den Einsatz bei sehr niedrigen Proteinmengen.

Als Kalibrierstandard diente mit Millipore-Wasser verdünntes Rinderserumalbumin (BSA, engl. bovine serum albumin) in einer Konzentrationsreihe zwischen 1,5 mg/ml und 0,125 mg/ml. Sowohl die Standard- als auch die Probenauftragung auf die 96-well-Platte erfolgte in Dreifachansatz. Dazu wurde in jedes well 5 µl Standard bzw. Probe pipettiert. Die Proben wurden zunächst unverdünnt aufgetragen. Nur im Falle einer nicht mehr messbaren (da zu hohen) Proteinkonzentration wurde die Messung mit Aqua dest. verdünnt wiederholt. Anschließend stellte man das sog. Reagenz A her, indem man beispielsweise 3 ml Reagenz A mit 60 µl Reagenz S vermischte und fügte dann davon 25 µl/well hinzu. Um die Farbreaktion zu starten wurden nun 200 µl Reagenz B in jede Platten-Vertiefung gebracht, die Platte vorsichtig geschwenkt und 15 min inkubiert. Gleich danach erfolgte die photometrische Konzentrationsbestimmung bei 650 nm gegen eine Nullprobe („blank“, d.h. nur Millipore-H₂O).

β-Aktin

Um sicherzugehen, dass in jeder Bande gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde neben der Proteinbestimmung ein Primärantikörper gegen β-Aktin verwendet. Bei β-Aktin handelt es sich um ein Zytoskelettfilament, welches in jeder Zelle gleich stark exprimiert sein sollte. Es handelt sich um ein sog. „housekeeping gen“ und wird in der Literatur allgemein als Ladekontrolle für Western Blots akzeptiert. Somit kann β-Aktin als Referenz für die Zellexpression und die Gesamt-Protein-Konzentration dienen.

Gelelektrophorese

Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte nach Molekulargewicht mithilfe eines 4-12 % Bis-Tris-Gels. Indem dieses Gel ein neutrales pH-Milieu sicherstellt, minimiert es Protein-Modifikationen. Jeweils 16 µl der Proteinlysate-Probe, 2,6 µl NuPAGE Sample Reduction Agent (10x) und 6,5 µl 4facher NuPAGE LDS Sample Buffer wurden 10 min lang bei 80 °C inkubiert und das Protein damit hitzedenaturiert. Dabei wurde darauf

geachtet, dass die Proteinkonzentration aller aufgetragenen Proben gleich war. Bei Inkonstanz wurden die Konzentrationen durch Verdünnung angeglichen. Der LDS-Puffer enthält Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate, SDS). Dieses negativ geladene Detergens bindet an hydrophobe Bezirke des Proteins, wobei das Molekül sich entfaltet und eine einheitliche stark negative Ladung erhält. So konnte sichergestellt werden, dass die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins zur Kathode nur proportional zu seinem Molekulargewicht ist - unabhängig von der ursprünglichen Ladung des Moleküls (Löffler, 2004). Des Weiteren beinhaltet der NuPAGE Sample Reduction Agent β -Mercaptoethanol, das durch Spaltung von Disulfidbrücken vor der Bildung neuer Sekundärstrukturen schützt. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gebracht, um eine weitere Denaturierung des Proteins zu vermeiden. Proben und ein Standard (Precision Plus Protein Standards, All Blue, Biorad) wurden nun vorsichtig in die zwölf Taschen des Sammelgels eingefüllt. Der verwendete Standard enthält Eichproteine bekannten Molekulargewichts mit deren Hilfe das Molekulargewicht des untersuchten Proteins bestimmt werden kann. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde eine Spannung von 150 V über das Gel angelegt und gewartet bis der blaue Längenmarker den unteren Gelrand erreicht hatte (ca. 45 min). Als Laufpuffer wurde dabei ein MOPS-SDS-Puffer (entweder fertiges Produkt der Fa. NuPAGE Invitrogen oder selbst angesetzt) verwendet. Der MOPS-Puffer wird vom Hersteller für die Separation mittlerer bis großer Proteine empfohlen.

Alle in diesem Abschnitt nicht explizit ausgenommenen Reagenzien wurden bei 4 °C gelagert.

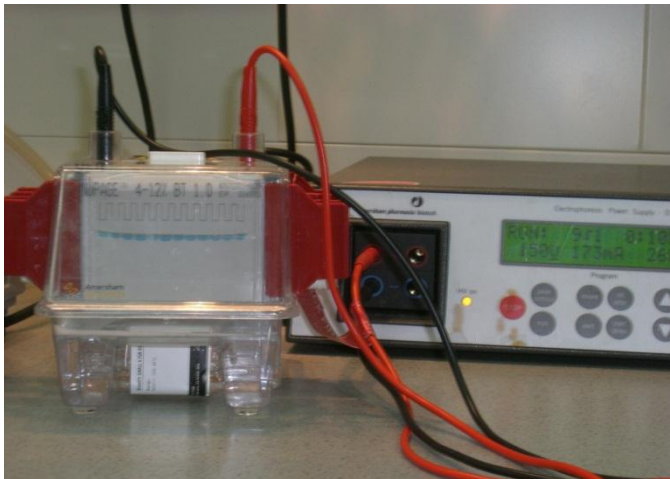


Abbildung 2-5: Gelelektrophorese-Einheit mit angeschlossener Spannungsquelle (150 V)

MOPS-SDS-Laufpuffer (20x):

50 mM MOPS

50 mM Tris

0,1 % SDS

1 mM EDTA

Millipore-H₂O

pH 7,7, Lagerung bei 4 °C

Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurden die Proteine von dem Trenn-Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, um die MAP-Kinasen anschließend mittels Antikörper detektieren zu können. Diese Übertragung eines nach der oben beschriebenen Methode aufgetrennten Proteingemisches auf eine Trägermembran wird als Western Blot bezeichnet. Zu diesem Zweck wurde das Gel aus seiner Kassette genommen, das Sammelgel wurde abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wurde für 15 min in Transfer-Puffer equilibriert. Die passend zugeschnittene Transferfolie wurde zunächst 15 sec in technischem Methanol getränkt und im Anschluss in Transfer-Puffer gelegt. Auf das Trenngel wurde luftblasenfrei die Transfermembran platziert. Gel und Folie gelangten zwischen zwei mit Transfer-Puffer

gewässerte Filterpapiere. Als äußerer Halteapparat fungierte ein Gitter, in dem zwei Schwämme das Verrutschen des Blots verhindern sollten. Dieser als „Sandwich“ bezeichnete Aufbau wurde in eine mit Transfer-Puffer gefüllte und mit einem Kühlelement ausgestattete Elektroblot-Kammer geschoben. Für 2 h wurde unter Kühlung über diese Box eine Spannung von 100 V angelegt.

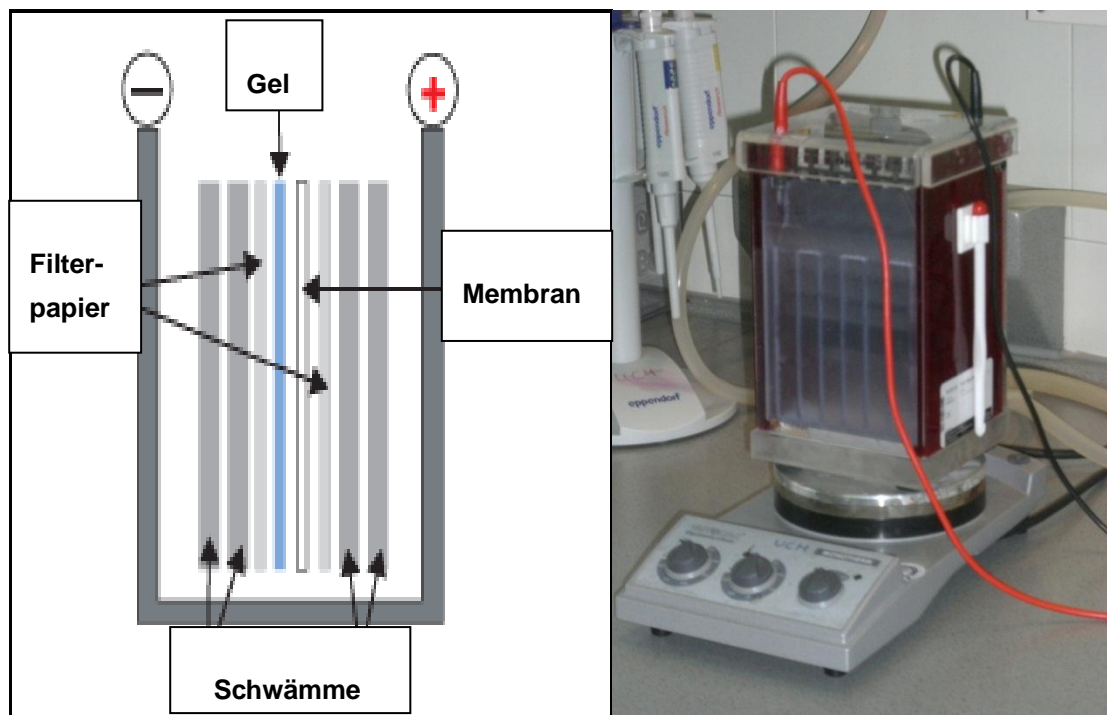


Abbildung 2-6: Aufbau des „Sandwiches“ und Blot-Kammer

Transfer-Puffer (20x):

25 mM Bicine

25 mM Bis-Tris

1 mM EDTA

pH 7,2, Lagerung bei 4 °C

Immunodetektion

Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Transfer entnommen und getrocknet oder sogleich weiterverarbeitet. Der Standard-Streifen wurde abgeschnitten und aufgehoben um zu überprüfen, ob die detektierten Banden tatsächlich mit den erwünschten, vom Antikörperhersteller beschriebenen Banden übereinstimmten. Im Falle keiner sofortigen Weiterverarbeitung musste die getrocknete und beschriftete Membran zunächst 1 min lang in technischem Methanol und anschließend 15 min in Transfer-Puffer + 0,05 % Tween (Tween 20 for electrophoresis, Sigma) rediluiert werden. Bei Raumtemperatur wurde die Membran für mindestens eine halbe Stunde in Blockierungslösung (Starting Block TBS, Pierce), welche ebenfalls mit 0,05 % Tween versetzt wurde, inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzudecken. Nachdem sich die Blot-Qualität insbesondere bei der JNK-Detektion als schlecht herausstellte, kamen zur Ergebnisverbesserung neben der genannten weitere Blocklösungen zum Einsatz: Eine 5%ige Lösung aus fettfreiem Trockenmilchpulver in PBS mit 0,05 % Tween sowie eine 3 %ige Lösung aus BSA in PBS plus 0,05 % Tween. Nach dem Abgießen der Blockierungslösung wurde die Folie zusammen mit dem Primärantikörper, der mit Starting Block + 0,05 % Tween auf die bei der Etablierung des Western Blots experimentell ermittelte Konzentration (s. Ergebnisse) verdünnt worden war, in kleinen Plastiktüten eingeschweißt. Dieser Antikörper wirkte mindestens 2 h unter Schüttelbewegungen ein. Der ungebundene Antikörper wurde anschließend in mehreren gründlichen Waschschritten mit PBS + 0,05 % Tween entfernt, wobei nach jedem Waschvorgang der Puffer gewechselt wurde. Pro Folie wurden ungefähr 500 ml Waschpuffer aufgewendet. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls mit Starting Block + 0,05 % Tween auf 1:1000 verdünnt. Die Nitrocellulosemembran wurde in ein Schälchen mit diesem Antikörper gelegt und inkubierte 60 min lang auf dem Schüttler unter Raumtemperaturbedingungen. Im Anschluss mehrmaliges Waschen mit PBS + 0,05 % Tween. Die Detektion der Antikörperkomplexe fand mit dem Western-Blot-Detektions-Kit (Super Signal West Dura Extended Duration Substrate, Pierce) statt. Die beiden Reagenzien wurden im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt und auf die Folie aufge-

bracht. Dieses Substrat wurde nach ca. 1 min wieder abgeschüttelt. Die nur noch leicht mit Substrat benetzte Membran wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine Autoradiographiekassette eingefügt. Auf Chemiluminenz-Filmen wurde die Belichtung durchgeführt. Die Filmentwicklung erfolgte mit der Entwicklungsmaschine Curix 60 von AGFA.

PBS:

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄O

2 mM KH₂PO₄O

H₂O

Nach Herstellung des Puffers wurde er autoklaviert. Lagerung bei Raumtemperatur.

Statistik

Zur Bestimmung der Signifikanz der Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen wurde als nicht-parametrischer Test der H-Test nach Kruskal und Wallis verwendet. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SigmaStat der Firma Systat Software GmbH, San José (USA), durchgeführt. Ein *p*-Wert < 0,05 wurde als signifikant akzeptiert. Die graphische Darstellung erfolgte mittels der Graphiksoftware SigmaPlot der Firma Systat Software GmbH, San José (USA).

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von 17β -Estradiol auf die Kollagen Typ II-Expression

Kollagen II wurde stellvertretend als knorpelspezifischer Bestandteil der extrazellulären Matrix herangezogen um die Syntheseleistung der Zellen zu beobachten.

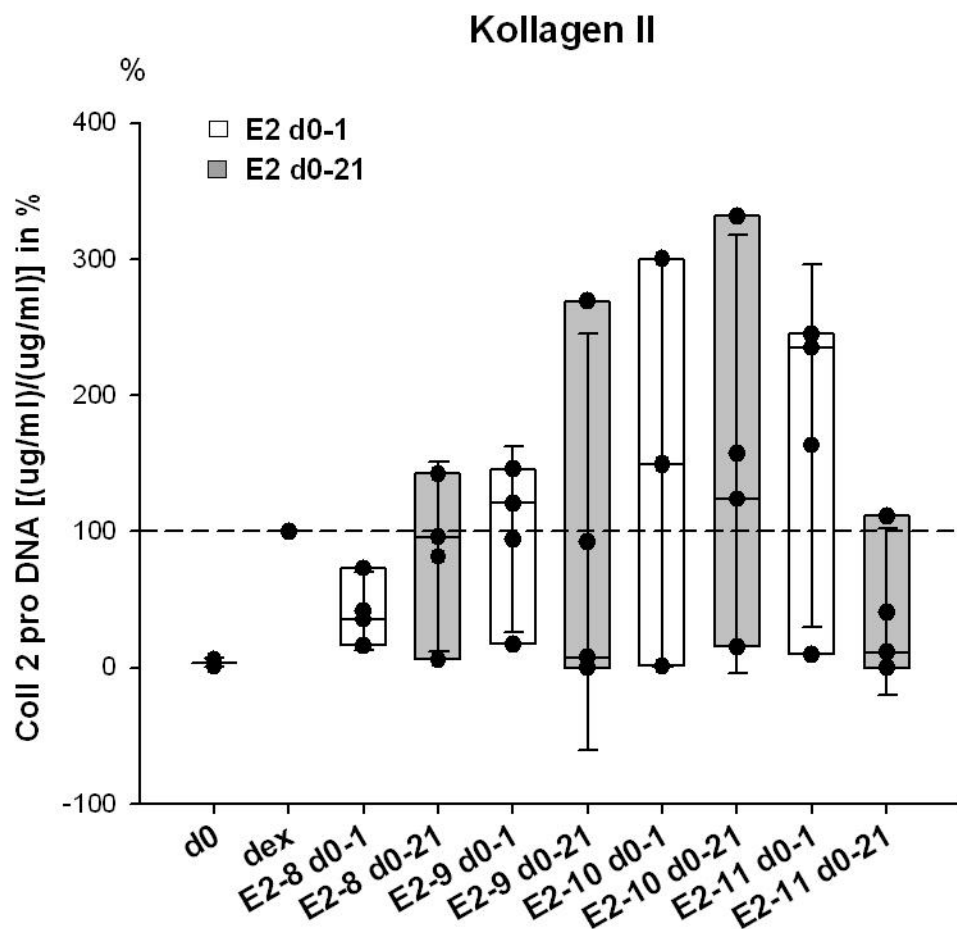


Abbildung 3-1: Effekte der unterschiedlichen Inkubationszeiten und Konzentrationen von 17β -Estradiol (E2) auf mesenchymale Stammzellen während der chondrogenen Differenzierung

Relative Kollagen Typ II-Konzentration pro DNA-Konzentration in Prozent; die Experimente wurden mit den hMSCs dreier Spender ($n=3$) durchgeführt, wobei jeweils ein Punkt für einen Spender steht; der 4. Punkt auf der Linie innerhalb der Kästchen zeigt den Median an; Darstellung der Daten in „box plots“, wobei die Kästchen jeweils den Bereich von der 25. bis zur 75. Perzentile repräsentieren; die Linien außerhalb der Kästchen kennzeichnen die 10. und 90. Perzentile;

Die östrogenfreie Negativkontrolle (dex) wurde als 100 %-Bezugspunkt gesetzt.

An Tag 0 (d0) war erwartungsgemäß innerhalb der Nachweisgrenze kein Kollagen Typ II in den Proben vorhanden, die prozentualen Werte der Kollagen II-Menge pro DNA-Menge liegen minimal über der 0 %-Marke.

Bei der Konzentration 10^{-8} M (E2-8 d0-1) zeigte sich ein geringerer Wert als bei den anderen Versuchsgruppen, ohne jedoch statistische Relevanz zu erreichen. Dies gilt für den Einwirkzeitraum von einem sowie von 21 Tagen.

Mit sinkender E2-Konzentration steigt der relative Kollagen II-Gehalt, wobei - mit Ausnahme der Gruppen der E2-Konzentration 10^{-11} M – die Gruppen der 21-tägigen Estradiol-Inkubation (E2 d0-21) höhere prozentuale Kollagen II-Werte als die Gruppen mit der eintägigen Einwirkzeit aufweisen.

3.2 Einfluss von 17 β -Estradiol auf die Glykosaminoglykan-Expression

Die Quantifizierung der sulphatierten Glykosaminoglykane (GAGs) erfolgte kolorimetrisch unter Anwendung eines DMMB-Assays. Um sich einen orientierenden Überblick über den Verlauf der ECM-Syntheseaktivität zu verschaffen, wurden wiederum als Bestimmungszeitpunkte die Tage 1 und 21 gewählt.

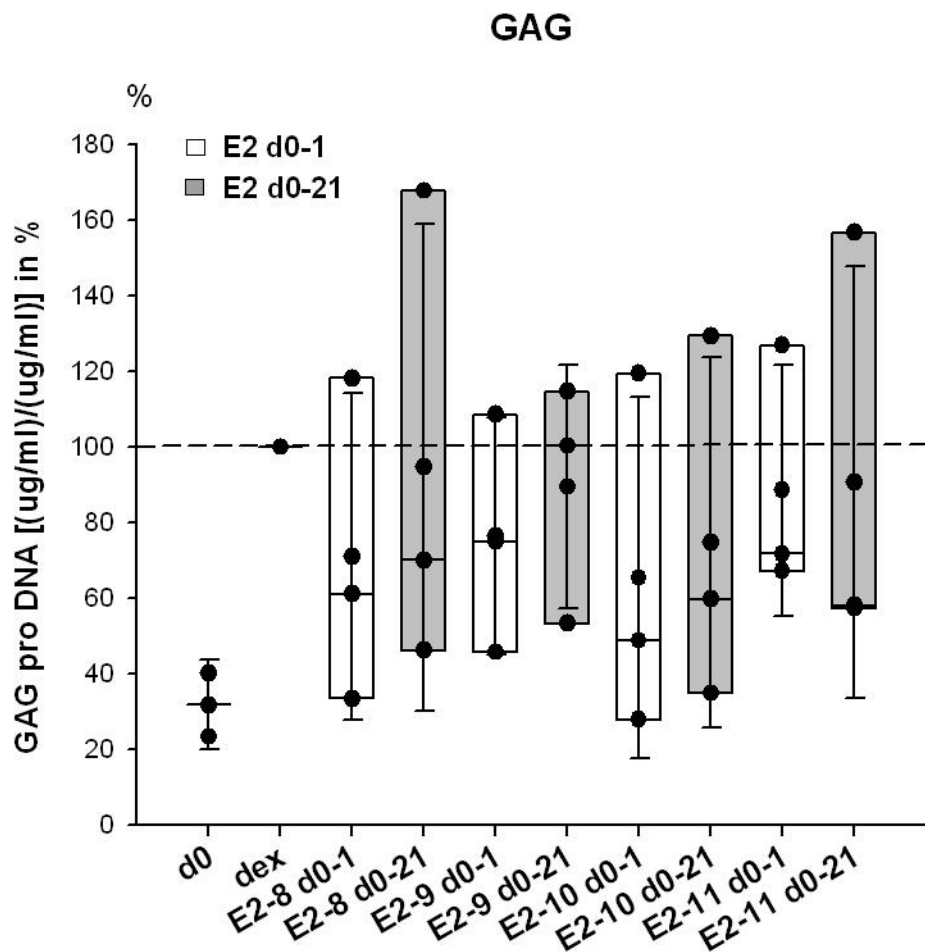


Abbildung 3-2: Effekte der unterschiedlichen Inkubationszeiten und Konzentrationen von 17 β -Estradiol (E2) auf mesenchymale Stammzellen während der chondrogenen Differenzierung

Relative GAG-Konzentration pro DNA-Konzentration in Prozent; die Experimente wurden mit den hMSCs dreier Spender ($n=3$) durchgeführt, wobei jeweils ein Punkt für einen Spender steht; der 4. Punkt auf der Linie innerhalb der Kästchen zeigt den Median an; Darstellung der Daten in „box plots“, wobei die Kästchen jeweils den Bereich von der 25. bis zur 75. Perzentile repräsentieren; die Linien außerhalb der Kästchen kennzeichnen die 10. und 90. Perzentile;

Der relative GAG-Gehalt pro DNA-Menge am Tag 0 liegt – wenn auch nicht ganz so niedrig wie im Falle des Kollagens vom Typ II – deutlich unter der 50%-Markierung.

Unter der Östrogenkonzentration 10^{-8} M (d0-21) ist analog zu den Kollagen II-Werten eine leichte Reduktion erkennbar. Zudem ist zwischen den einzelnen Östrogenkonzentrationen bezüglich des GAG-Gehalts kein signifikanter Unterschied erkennbar.

3.3 DNA-Gehalt

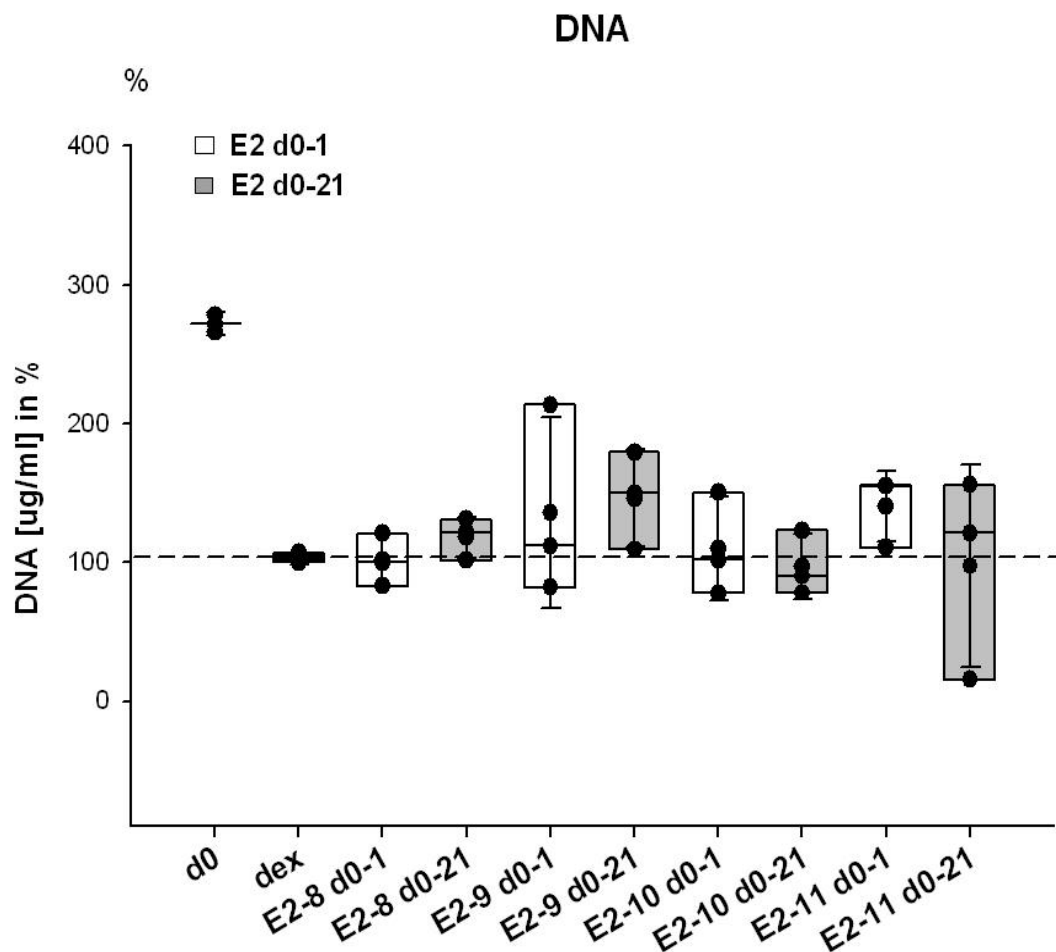


Abbildung 3-3: Effekte der unterschiedlichen Inkubationszeiten und Konzentrationen von 17 β -Estradiol (E2) auf mesenchymale Stammzellen während der chondrogenen Differenzierung

Prozentualer DNA-Gehalt; die Experimente wurden mit den hMSCs dreier Spender ($n=3$) durchgeführt, wobei jeweils ein Punkt für einen Spender steht; der 4. Punkt auf der Linie innerhalb der Kästchen zeigt den Median an; Darstellung der Daten in „box plots“, wobei die Kästchen jeweils den Bereich von der 25. bis zur 75. Perzentile repräsentieren; die Linien außerhalb der Kästchen kennzeichnen die 10. und 90. Perzentile;

Aus der Graphik wird deutlich, dass zu Beginn des Beobachtungszeitraums im Vergleich zu Tag 21 fast der dreifache DNA-Gehalt in den Proben vorhanden war.

Nach 21tägiger Kulturdauer zeigen sich keine relevanten Unterschiede zwischen den DNA-Werte, welche alle nah am Wert der Kontrollgruppe (dex) platziert sind.

Als Tendenz zeigen sich die DNA-Konzentrationen der Proben, auf die das 17 β -Estradiol 21 Tage lang einwirkte, als etwas niedriger im Vergleich zu den Gruppen, die nur einen Tag lang durch das Hormon stimuliert wurden.

3.4 Histologie

3.4.1 Kollagen Typ II-Immunhistochemie

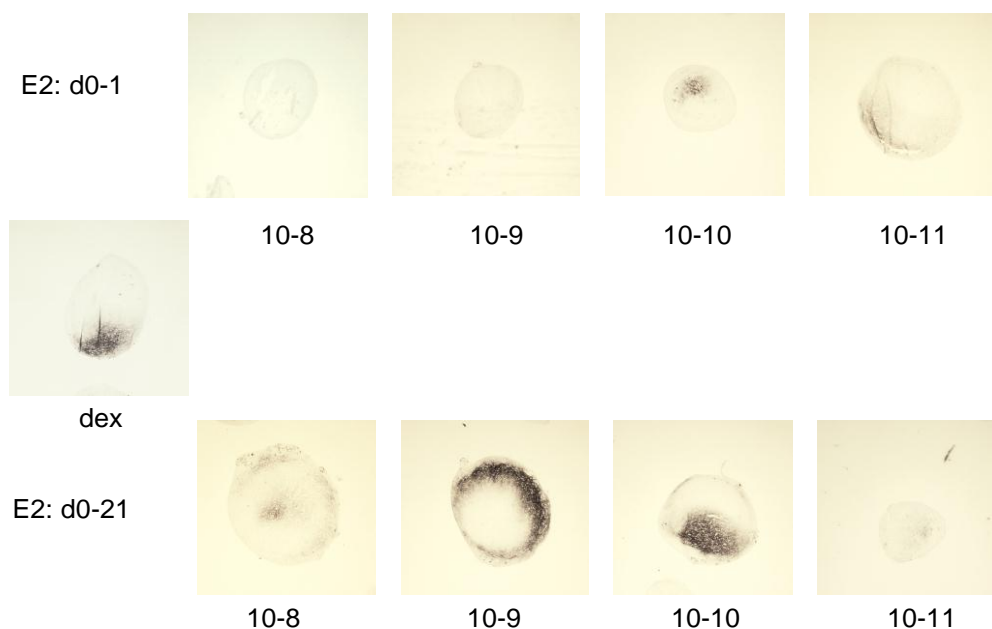


Abbildung 3-4: : Immunhistochemische Kollagen II-Färbung: Makroskopische Darstellung der aus hMSCs bestehenden Zellaggregaten während der chondrogenen Differenzierung; Die Aggregate der oberen Reihe wurden für einen Tag mit 17 β -Estradiol unterschiedlicher Konzentration inkubiert, wohingegen die Aggregate der unteren Reihe 21 Tage lang zusätzlich zum Chondrogenese-Medium mit E2 versetzt wurden. Die nur mit Dexamethason-haltigem, E2-freiem Differenzierungsmedium versetzte Gruppe (dex) diente als Kontrolle. Gezeigt sind repräsentative Schnitte für die jeweilige Versuchsgruppe.

Die angewandte Färbung lässt das Kollagen II schwarz erscheinen. Im Allgemeinen fällt auf, dass die Gruppen der E2-Inkubation über 21 Tage – mit Ausnahme der 10⁻¹¹ M E2-

Gruppe - eine stärker betonte Darstellung des knorpelspezifischen Typ II-Kollagens zeigen.

Des Weiteren zeigt sich auch hier – wie schon im Kollagen II-ELISA – eine im Vergleich zur Kontroll-Dexamethason-Gruppe schwächere Anfärbung der Gruppe, die mit 17β -Estradiol der Konzentration 10^{-8} M behandelt wurde. Diese Minderung ist vor allem bei den über 21 Tage E2-inkubierten Zellaggregaten augenscheinlich. Darüber hinaus stellte sich bei diesem längeren Versuchszeitraum insbesondere eine verstärkte Kollagen II-Bildung bei den E2-Konzentrationen 10^{-9} und 10^{-10} M dar, wohingegen bei der Konzentration 10^{-11} M weniger stark für Kollagen II angefärbt wurde.

3.4.2 Dimethylmethylenblau-Färbung

Ähnlich der Kollagen II-Immunhistochemie zeigen sich die Gruppen mit der E2-Konzentration von 10^{-8} M auch bei der GAG-Färbung geringer angefärbt. Allerdings präsentiert sich dieser Effekt nur bei eintägiger und nicht bei 21-tägiger Östrogen-Inkubation.

Der längere Versuchszeitraum (d0-21) erzielt eine stärkere Violettfärbung, was auf eine größere GAG-Produktion im Vergleich zu den Zellaggregaten der 1 Tag-E2-Behandlung schließen lässt.

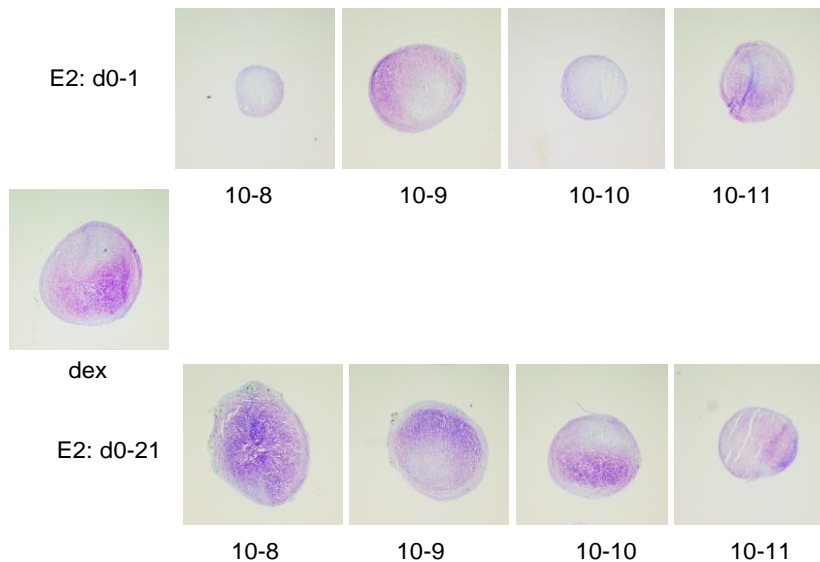


Abbildung 3-5: 1,9Dimethylmethylenblau-Färbung der sulphatierten Glykosaminoglykane: Makroskopische Darstellung der aus hMSCs bestehenden Zellaggregaten während der chondrogenen Differenzierung;

Die Aggregate der oberen Reihe wurden für einen Tag mit 17 β -Estradiol unterschiedlicher Konzentration inkubiert, wohingegen die Aggregate der unteren Reihe 21 Tage lang zusätzlich zum Chondrogenese-Medium mit E2 versetzt wurden. Die nur mit Dexamethason-haltigem, E2-freiem Differenzierungsmedium versetzte Gruppe (dex) diente als Kontrolle. Gezeigt sind repräsentative Schnitte für die jeweilige Versuchsgruppe.

3.5 Western Blot

3.5.1 Nachweis der beiden klassischen Steroidrezeptoren ER- α und ER- β

Beide Rezeptoren konnten in Zelllysaten nach eintägiger Kulturdauer nachgewiesen werden. Eine Abhängigkeit von der gewählten Hormonkonzentration zeigte sich nicht.

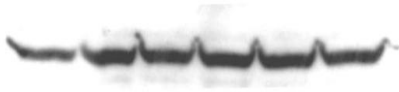
ER- α 

Abbildung 3-6: Western Blot-Analyse: Expressionsnachweis des klassischen ER- α bei hMSCs während der chondrogenen Differenzierung (d0-1);

ER- β 

Abbildung 3-7: Western Blot-Analyse: Expressionsnachweis des klassischen ER- β bei hMSCs während der chondrogenen Differenzierung (d0-1);

3.5.2 Etablierung der Western Blot-Technik zur Detektion der MAPK

Zunächst galt es die optimale Konzentrationen und Inkubationszeiten der verschiedenen Primär- sowie des Sekundär-Antikörpers herauszufinden. Dazu wurde Protein von gleich behandelten Zellen elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Anschließend zerteilte man die Membran in „Teststreifen“, welche mit den unterschiedlichen Antikörper-Konzentrationen behandelt wurden. Zum Einsatz kam eine Konzentrationsbreite von 1:300 bis 1:3000 beim Primärantikörper sowie von 1:1000 bis 1:3000 beim Sekundärantikörper. Dabei kristallisierte sich heraus, dass sowohl bei den primären als auch bei den sekundären Antikörpern eine Verdünnung auf 1:1000 unter den gegebenen experimentellen Umständen optimale Ergebnisse ergab.

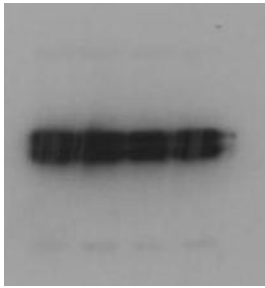


Abbildung 3-9: Western Blot-Etablierung ERK

Primärer Anti-ERK-AK: 1:300 verdünnt, Sekundär-AK: 1:1000 verdünnt

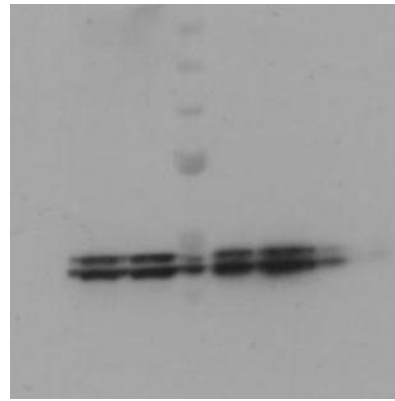


Abbildung 3-8: Western Blot-Etablierung ERK

Primärer Anti-ERK-AK: 1:1000 verdünnt, Sekundär-AK: 1:1000 verdünnt, 3. Bande = Marker

In Bezug auf die Einwirkzeiten der Antikörper ergab die Inkubation über 12 Stunden des Primär-Antikörpers keine Verbesserung im Vergleich zu einer zweistündigen Inkubationsdauer. Folglich wurde eine Inkubations-Mindestdauer für den primären Antikörper von zwei Stunden festgelegt.

Die angesetzte einstündige Einwirkphase des sekundären Antikörpers stellte sich als ausreichend heraus und führte bei Verlängerung (bis 12 Stunden) nicht zu einer Verbesserung der Blotqualität.

Eine Verlängerung der Inkubationszeit der Blockierlösung von zunächst 30 Minuten auf eine Stunde ging mit einer weiteren Verbesserung des Blot-Ergebnisses einher.

Im Verlauf der Experimente verschlechterte sich die Signalqualität der Detektion und eine unspezifische Hintergrundfärbung trat auf. Zur Qualitätsverbesserung durch Minimierung des „Hintergrundrauschens“ auf den Blots wurden verschiedene Blockierlösungen eingesetzt. In den durchgeführten Versuchsreihen (Starting Block-Lösung mit 0.05 % Tween, eine 5%ige Lösung aus fettfreiem Trockenmilchpulver in PBS mit 0.05 %

Tween sowie eine 3 %ige Lösung aus BSA in PBS plus 0.05 % Tween) zeigte das Trockenmilchpulver die wenigsten unspezifischen Banden

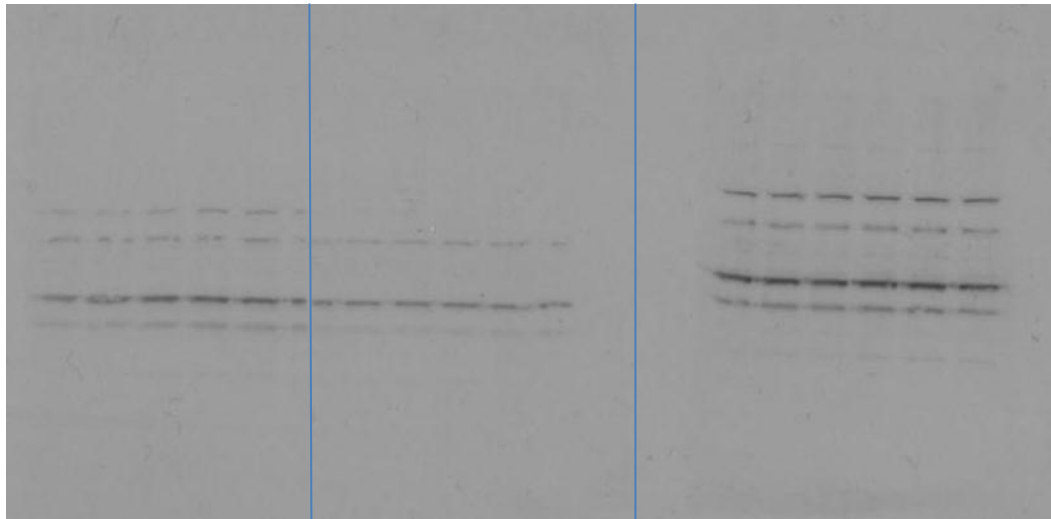


Abbildung 3-10: Western Blot-Etablierung: Vergleich der Blockierlösungen

Starting Block	Trockenmilch	BSA
----------------	--------------	-----

3.5.3 MAPK-Aktivierung durch 17 β -Estradiol

Als Referenz bzw. Kontrolle dienten stets unbehandelte Zellen („K“ für Kontrolle).

Konzentrationsabhängigkeit der E2-abhängigen MAPK-Aktivierung nach 9 und 90minütiger Stimulation

Um die zeitliche Differenz zwischen genomischen und nicht-genomischen Effekten auf dem Expressionsniveau zu erfassen und da andere Studien mit diesen Zeiträumen bereits sinnvolle Resultate erzielten, wurden die beiden 17 β -Estradiol-Inkubationszeiträume 9 und 90 min gewählt.

Die Östrogenstimulation wurde in einem Bereich von 10^{-7} bis 10^{-11} M durchgeführt.

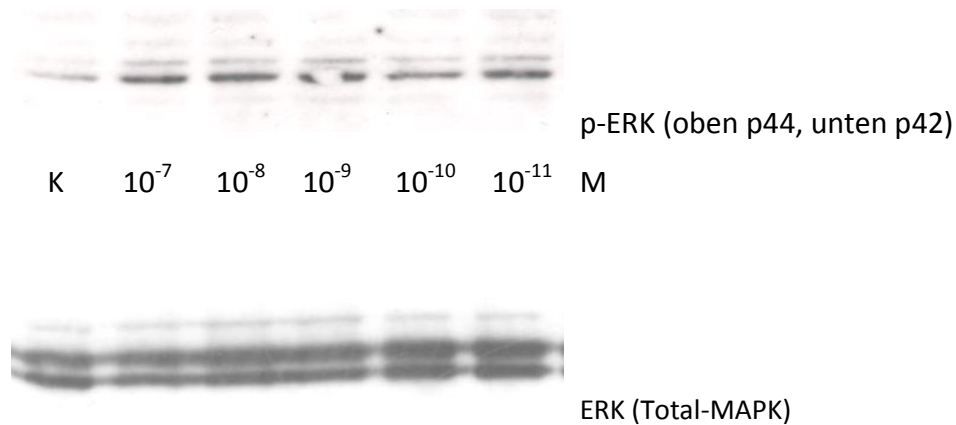
ERK-Detektion:**9 min:**

Abbildung 3-11: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-ERK (unten) und Phospho-ERK (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden 9 min mit 17β -Estradiol unterschiedlicher Konzentrationen sowie zur Kontrolle (K) ohne E2-Zusatz inkubiert;

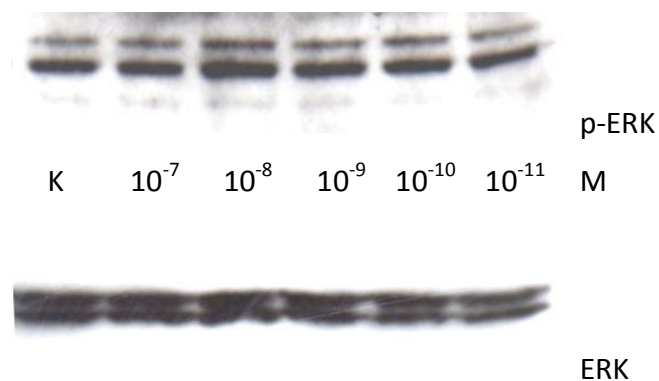
90 min:

Abbildung 3-12: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-ERK (unten) und Phospho-ERK (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden 90 min mit 17β -Estradiol unterschiedlicher Konzentrationen sowie zur Kontrolle (K) ohne E2-Zusatz inkubiert;

Der Anti-ERK-Antikörper macht eine Doppelbande bei 44 und 42 kDa sichtbar, da er die beiden Isoenzyme ERK1 und ERK2 erkennt.

Bei einer Einwirkzeit des 17β -Estradiols von 9 min präsentiert der Blot des Total-ERKs ein gleichmäßiges Aktivierungsmuster: Es lässt sich kein spezifischer Unterschied

zwischen der Bande der unbehandelten, E2-freien Zellen (K) und den Banden der verschiedenen Estradiol-Konzentrationen ausmachen. Da die unphosphorylierte ERK-Form den Hauptanteil am Gesamt-ERK-Vorkommen bereitstellt, lässt sich die Aussage treffen, dass diese inaktive Form in allen Gruppen gleichmäßig vorliegt. Wohingegen sich bei der Detektion von Phospho-ERK bei der 9minütigen Inkubation eine deutliche Intensitätszunahme der Estradiol-stimulierten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigt. Dies spricht für eine Einflussnahme des 17β -Estradiols. Vor allem die Konzentrationen $10^{-9} - 10^{-7}$ M scheinen ein Aktivierungsmaximum zu evozieren. Die Banden der Konzentrationen 10^{-10} und 10^{-11} M liegen zwar immer noch deutlich über dem Level der unbehandelten Zellen, jedoch zeigt sich eine leichte Abnahme der Leuchtintensität.

Die 90 min-Inkubation führte bei Gesamt-ERK ähnlich wie bei der 9 min-Inkubation zu einem einheitlichen Bild ohne große Differenzen bzw. Maxima bezüglich der Bandenintensität. Allerdings wiederholt sich diese Gleichförmigkeit annäherungsweise beim Phospho-ERK-Blot: Lediglich ein Aktivierungsmaximum bei der E2-Konzentration 10^{-8} M sticht heraus.

p38:

9 min:

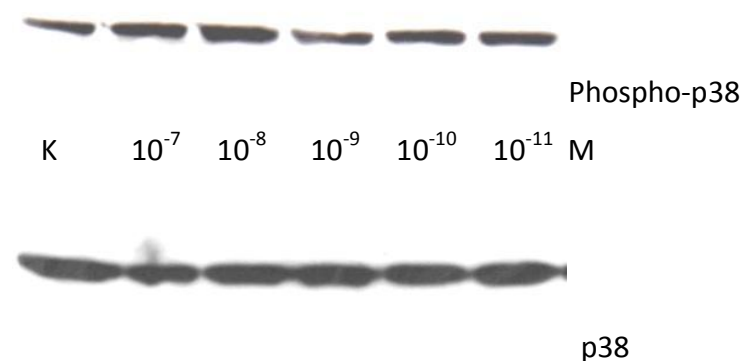


Abbildung 3-13: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-p38 (unten) und Phospho-p38 (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden 9 min mit 17β -Estradiol unterschiedlicher Konzentrationen sowie zur Kontrolle (K) ohne E2-Zusatz inkubiert;

90 min:

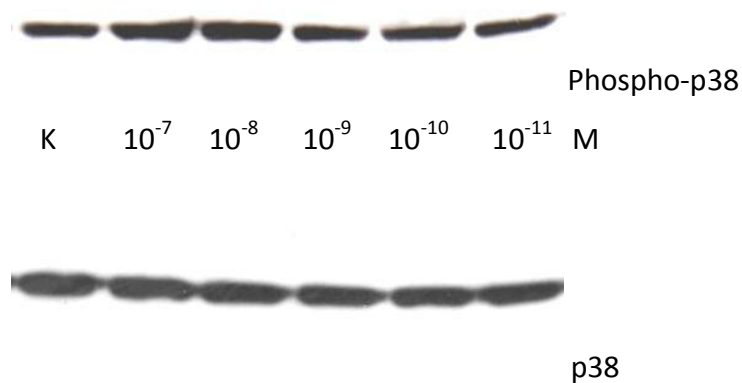


Abbildung 3-14: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-p38 (unten) und Phospho-p38 (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden 90 min mit 17β -Estradiol unterschiedlicher Konzentrationen sowie zur Kontrolle (K) ohne E2-Zusatz inkubiert;

Die Detektion der Stress-sensiblen Kinase p38 im Anschluss an eine 9minütige E2-Inkubation führt zu dem Ergebnis einer Einzelbande bei 38 kDa. Dabei ist zwischen der Kontrollbande und den hormonbehandelten Gruppen kein relevanter Intensitätsunterschied zu erkennen. Die Phospho-p38-Kinase liegt in der E2-freien Kontroll-Gruppe in geringerem Ausmaß vor als in den Estradiol-stimulierten Gruppen. Vor allem erzeugen auch hier die mit einer Konzentration von 10^{-8} M behandelten Zellen die maximale Intensität. Darüber hinaus lässt dieser 9 min-Phospho-p38-Blot die Existenz einer Östrogen-Aktivierungskurve erahnen: Von 10^{-7} M bis zum Maximum bei 10^{-8} M steigt die Intensität an, um danach von 10^{-9} bis 10^{-11} M wieder abzufallen.

Die 17β -Estradiol-Stimulierung über 90 min resultiert in einer ganz ähnlichen Intensitätsverteilung: Gleichmäßige Bandenbreite bei Total-p38 sowie im Vergleich zu den behandelten Zellen verminderte Expression der phosphorylierten Form bei den unbehandelten Zellen. Des Weiteren stellt sich auch hier wieder das parabelförmig anmutende Aktivierungsmuster mit einem Optimum bei einer E2-Konzentration von 10^{-8} M dar. Lediglich der Signalintensitätsunterschied zwischen der Kontrollbande und den Banden mit Hormonstimulation tritt nicht so gravierend wie im Falle der 9 min-Inkubation hervor.

Probleme bei der Etablierung der Phospho-JNK-Detektion

Von Beginn der Experimente an erwies sich die Signalqualität bei der Phospho-JNK-Detektion als schlecht: Eine starke, unspezifische Hintergrundfärbung wie auch die schwache „Leuchtintensität“ der erwünschten JNK-Banden beeinträchtigten die Auswertbarkeit dieser MAPK negativ. Aus diesem Grund versuchte man durch Variation mehrerer Parameter die Signalgüte zu verbessern: Zunächst verlängerte man die Blockzeit, in der unspezifische Proteinbindungsstellen besetzt werden sollen, von 30 Minuten auf eine Stunde. Als dies in keiner wesentlichen Verbesserung resultierte, kamen unterschiedliche Blockierlösungen zum Einsatz (s. *Etablierung der Western Blot-Technik zur Detektion der MAPK*). Schließlich verminderte man unabhängig voneinander die Konzentration des Primär- als auch des Sekundär-Antikörpers: Die ursprüngliche für den primären und den sekundären AK gleiche Konzentration von 1:1000 wurde auf 1:2000 und 1:3000 reduziert und in verschiedensten Kombinationen ausgetestet. Es stellte sich allerdings heraus, dass die Verdünnung der Antikörper-Konzentration zwar das unspezifische Hintergrundrauschen verbesserte, allerdings dabei zu Lasten der Bandenintensität ging. Auch eine Intensivierung der Waschschrte nach den AK-Inkubationen brachte keine Qualitätssteigerung. Selbst der Einsatz einer neuen Charge des Phospho-JNK-Primär-Antikörpers führte zu keiner Ergebnisverbesserung.

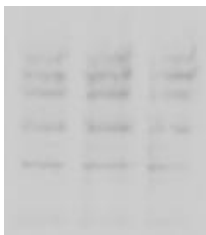


Abbildung 3-16: Western Blot Etablierung JNK

Primärer Anti-JNK-AK: 1:1000 verdünnt,
Sekundär-AK: 1:3000 verdünnt;

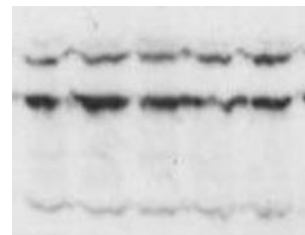


Abbildung 3-15: Western Blot-Etablierung JNK

Primärer Anti-JNK-AK: 1:3000 verdünnt,
Sekundär-AK: 1:2000 verdünnt;

Zeitabhängigkeit der E2-abhängigen MAPK-Aktivierung

Um einen Zusammenhang zwischen der E2-Inkubationszeit und einer MAPK-Aktivierung zu untersuchen, wurden die Zellen für die Zeiträume von 1, 3, 6, 9, 15, 30, 45, 60, 120, 180 und 240 min mit 17β -Estradiol der Konzentration 10^{-8} M inkubiert. Die Wahl dieser Konzentration gründete auf dem in den Konzentrationsabhängigkeitsuntersuchungen häufig vorgefundenen Aktivierungsmaximum im Bereich von 10^{-8} M.

ERK:

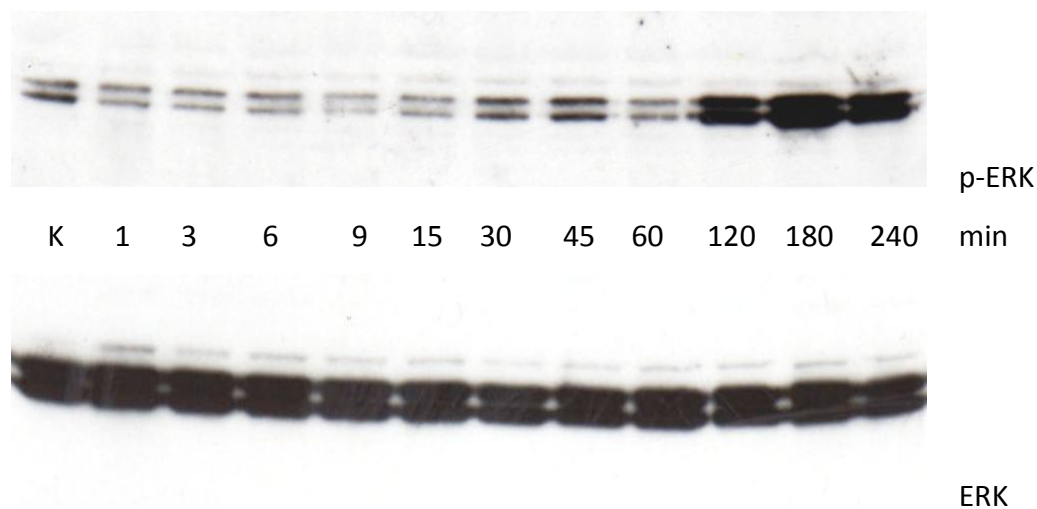


Abbildung 3-17: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-ERK (unten) und Phospho-ERK (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden für Zeiträume zwischen 1 und 240 min mit 17β -Estradiol der Konzentration 10^{-8} M sowie zur Kontrolle (K) ohne E2-Zusatz inkubiert;

Bei der Detektion von Gesamt-ERK liegen alle Gruppen inklusive der Kontrollgruppe auf einem annähernd gleichen Aktivierungsniveau. Hingegen zeigen sich, was den Phosphorylierungsstatus von ERK anbelangt, deutliche Unterschiede: Auf eine besonders hohe Signalintensität trifft man bei den E2-Inkubationszeiträumen 120, 180 und 240 min. Mit der Ausnahme bei 60 min lässt sich von einem mit der Einwirkdauer ansteigenden Aktivierungsverlauf sprechen. Allerdings zeigt auch die unbehandelte Kontrollgruppe eine deutliche Aktivierung.

p38:

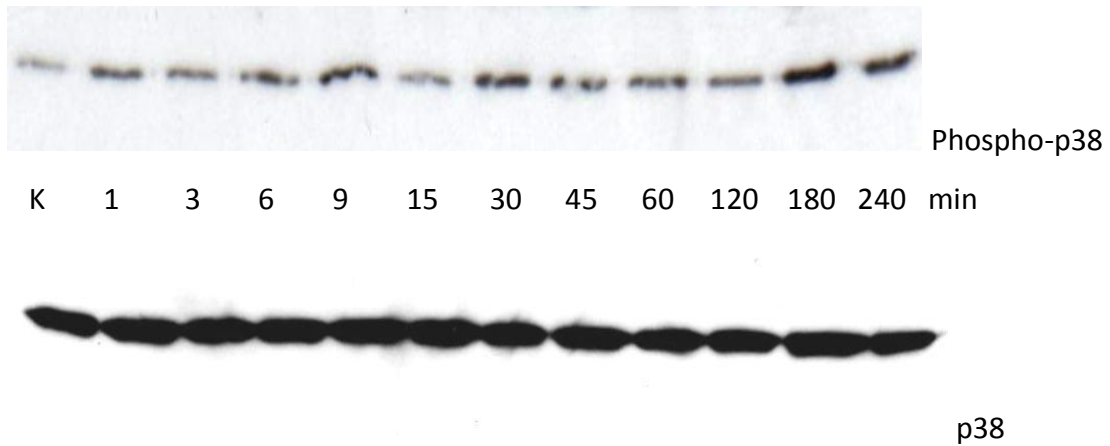


Abbildung 3-18: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-p38 (unten) und Phospho-p38 (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden für Zeiträume zwischen 1 und 240 min mit 17 β -Estradiol der Konzentration 10 \cdot 10 $^{-8}$ M sowie zur Kontrolle (K) ohne E2-Zusatz inkubiert;

Der Total-p38-Blot präsentiert weder in der Kontrolle noch in den Gruppen der variierenden Inkubationszeiten „Intensitätsausreißer“. Der Aktivierungsverlauf der phosphorylierten und damit aktiven p38-MAPK zeigt keine klare Tendenz und erscheint deswegen schwer nachvollziehbar. Jedoch sind die E2-stimulierten Gruppen im Vergleich zur Kontrollbande von größerer Signalintensität.

Experimente mit E2-BSA und ICI182,780

ERK (Vgl. 9/90 min):

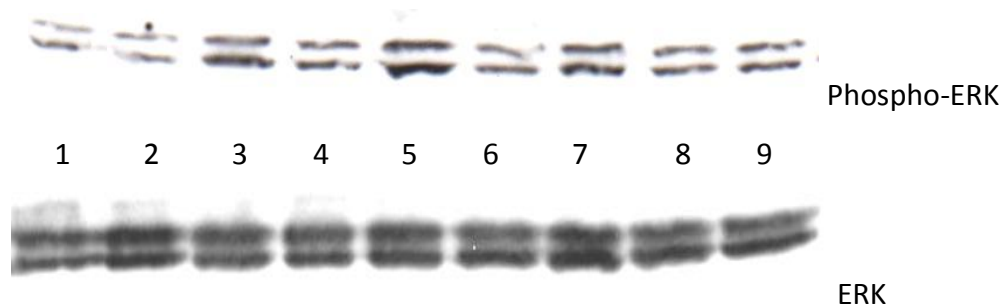


Abbildung 3-19: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-ERK (unten) und Phospho-ERK (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden 9 und 90 min mit E2-BSA und ICI182,780 (s. Legende) sowie zur Kontrolle ohne E2-Zusatz inkubiert;

Legende:

- 1 unbehandelte Kontrolle
- 2 E2-BSA (Konz.: 10^{-9} M), 9min
- 3 E2-BSA (Konz.: 10^{-9} M), 90 min
- 4 ICI182,780 (Konz.: 10^{-7} M), 9 min
- 5 ICI182,780 (Konz.: 10^{-7} M), 90 min
- 6 und 7 E2-BSA (Konz.: 10^{-9} M) + ICI182,780 (Konz.: 10^{-7} M), 9 min
- 8 und 9 E2-BSA (Konz.: 10^{-9} M) + ICI182,780 (Konz.: 10^{-7} M), 90 min

Sowohl die jeweils 90minütige Inkubation mit E2-BSA (Konz.: 10^{-9} M) (Bande 3) als auch mit ICI (Konz.: 10^{-7} M) (Bande 5) rief eine stärkere ERK-Phosphorylierung hervor. Der Phosphorylierungsstatus der MAPK in unbehandelten Zellen (Bande 1) stellte sich als gering dar. Allerdings verzeichnete auch die 9min-E2-BSA-Inkubation (Bande 2) keine wesentlich höhere Aktivierung als die Kontrollgruppe. Auffallend war, dass bei gleichzeitig blockierten klassischen Östrogen-Rezeptoren (durch ICI) und E2-Membranundurchlässigkeit (durch E2-BSA) sowohl bei 9- (Banden 6 und 7) als auch bei 90-minütiger (Banden 8 und 9) Einwirkdauer die Signalintensität geringer ausfiel als bei der 90 min-Inkubation mit E2-BSA (Bande 3) und ICI182,780 (Bande 5) jeweils einzeln.

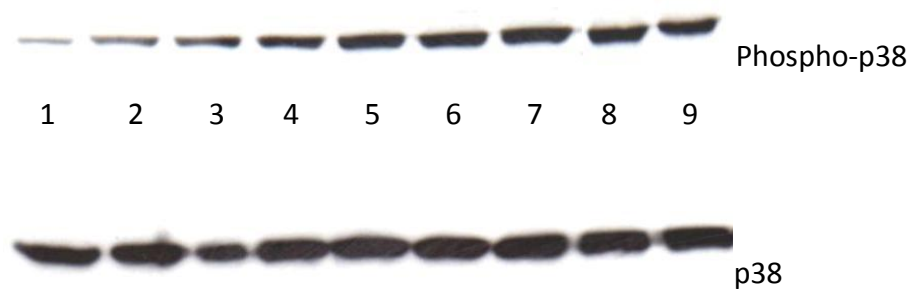
p38 (Vgl. 9/90 min):

Abbildung 3-20: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-p38 (unten) und Phospho-p38 (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden 9 und 90 min mit E2-BSA und ICI182,780 (s. Legende) sowie zur Kontrolle ohne E2-Zusatz inkubiert;

Legende:

- 1 unbehandelte Kontrolle
- 2 E2-BSA (Konz.: 10^{-9} M), 9min
- 3 E2-BSA (Konz.: 10^{-9} M), 90 min
- 4 ICI182,780 (Konz.: 10^{-7} M), 9 min
- 5 ICI182,780 (Konz.: 10^{-7} M), 90 min
- 6 und 7 E2-BSA (Konz.: 10^{-9} M) + ICI182,780 (Konz.: 10^{-7} M), 9 min
- 8 und 9 E2-BSA (Konz.: 10^{-9} M) + ICI182,780 (Konz.: 10^{-7} M), 90 min

Die Abbildung zeigt, dass die Inkubation der Zellen mit E2-BSA (Bande 2 und 3) in einer Konzentration von 10^{-9} M den Phosphorylierungsstatus der MAPK p38 nicht so stark erhöhen konnte wie die Behandlung der Zellen mit einer Kombination aus E2-BSA (Konz.: 10^{-9} M) und ICI182,780 (Konz.: 10^{-7} M) (Banden 6 – 9). Auffallend war dabei, dass die Inkubation mit ICI182,780 alleine (Banden 4 und 5) eine höhere Stimulation hervorrief als die alleinige E2-BSA-Behandlung. Die Kombinationsstimulation der Banden 6 bis 9 wies dabei durchweg ein höheres Aktivierungsniveau auf als die 9minütige ICI-Stimulierung (Bande 4). Die 90 min-Intensität (Bande 5) war allerdings in ihrer Signalintensität kaum von der Ko-Inkubation (Banden 6 – 9) zu unterscheiden.

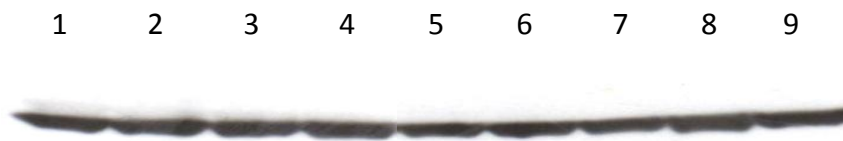


Abbildung 3-23: β -Aktin als Western Blot-Ladekontrolle: Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden für 9 und 90 min mit E2-BSA und ICI182,780 (s. Legende) sowie zur Kontrolle ohne E2-Zusatz inkubiert;

Legende:

1 unbehandelte Kontrolle

2 E2-BSA (Konz.: 10^{-9} M), 9min

3 E2-BSA (Konz.: 10^{-9} M), 90 min

4 ICI182,780 (Konz.: 10^{-7} M), 9 min

5 ICI182,780 (Konz.: 10^{-7} M), 90 min

6 und 7 E2-BSA (Konz.: 10^{-9} M) + ICI182,780 (Konz.: 10^{-7} M), 9 min

8 und 9 E2-BSA (Konz.: 10^{-9} M) + ICI182,780 (Konz.: 10^{-7} M), 90 min

Wie die Blots zeigen, wurde β -Aktin sowohl bei der Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit (Abbildung 3-21) als auch im Zeitabhängigkeits-Versuch (Abbildung 3-22) quantitativ gleichermaßen exprimiert.

Aufgrund seiner konstanten Expression wiederum als „loading control“ herangezogen, zeigte β -Aktin bei den E2-BSA-ICI182,780-Experimenten (Abbildung 3-23) in allen Auftragungen ebenfalls Signalkontinuität.

4 Diskussion

Tissue Engineering von chondralem Gewebe bietet für fokale, traumatische Knorpeldefekte beim jungen Patienten ein hoffnungsvolles Therapie-Konzept (Lee, 2004) - mit einer enormen Komplexität der Einfluss ausübenden Faktoren (Nasatzky, 1993). Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle beeinflussen die Zellproliferation und -differenzierung und können so gezielt eingesetzt werden um das Tissue Engineering in vitro zu optimieren. Das ermöglicht die Qualitätssteigerung des hergestellten Knorpels in vivo. Diese Herangehensweise verkörpert der Begriff „Guided Tissue Engineering“ (Brochhausen, 2009). Die Identifizierung der beeinflussenden Moleküle erlangt im modernen Tissue Engineering einen immer höheren Stellenwert. Dabei ist besonderes Augenmerk auf die Interaktion der Zellen mit ihrer natürlichen oder artifiziellen Umgebung und die sich daraus ergebenden strukturellen oder funktionellen Folgen zu legen. Es gelang der Nachweis von Zytokinen, die die Produktion der extrazellulären Matrix (ECM) herauf- bzw. herabregulieren (Goldring, 1999).

Es wird eine Korrelation zwischen Arthroseentstehung und dem weiblichen Sexualhormon Estradiol diskutiert. Bereits 1971 beschrieb Silberberg eine durch Östrogen ausgelöste vorübergehende Hemmung der Proteoglykansynthese sowie eine Steigerung der Kollagensynthese (Silberberg, 1971). Transkripte der beiden Östrogen-Rezeptoren ER α und - β sind bei aus arthrotischen Hüften und Knien stammenden Knorpelzellen identifiziert worden (Richette, 2003; Ushiyama, 1999). Ebenso gelang die Detektion von Östrogen-Rezeptoren aus gesundem adultem Knorpelgewebe (Tankó, 2008; Herrero-Beaumont, 2009). Diese Erkenntnisse weisen adulten Knorpel als östrogen-sensibles Gewebe aus.

Die Einflussnahme von 17 β -Estradiol auf die chondrogene Differenzierung adulter mesenchymaler Stammzellen ist bis dato noch nicht abschließend geklärt. Vor allem im Hinblick auf die Entwicklung einer geschlechtsabhängigen Behandlung im Rahmen der regenerativen Medizin spielt diese Fragestellung eine Rolle.

Als Marker für die Qualität des beim Tissue Engineering konstruierten Knorpels fungiert vornehmlich die Syntheseleistung der mesenchymalen Stammzellen während

ihrer chondrogenen Differenzierung. Aus diesem Grund lautete eine Fragestellung dieser Arbeit, ob 17β -Estradiol eine Kurzzeitwirkung auf die ECM-Syntheseleistung humaner mesenchymaler Stammzellen während ihrer chondrogenen Differenzierung besitzt.

Im Vorfeld konnten schon andere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe einen dosisabhängigen inhibitorischen Effekt des 17β -Estradiols bei 21-tägiger Inkubationszeit auf die Kollagen II- und Glykosaminoglykanproduktion beschreiben (Jenei-Lanzl, 2010). In den durchgeführten in vitro-Experimenten sahen wir ebenfalls eine Hemmung der Chondrogenese durch 17β -Estradiol mit verminderter Kollagen II- und Glykosaminoglykan-Produktion sowie makroskopisch kleineren Aggregaten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Hemmung zeigte sich im Gegensatz zum von Jenei-Lanzl gefundenen inhibitorischen E2-Effekt nach 21 Tagen bereits nach einer 17β -Estradiol-Inkubation von einem Tag.

Die Hemmung der Kollagen II-Produktion stellte sich bei der eintägigen E2-Stimulation größer dar als nach 21 Tagen E2-Zusatz der Konzentration 10^{-8} M. Auch in der Histologie zeigten die mit der E2-Konzentration 10^{-8} M behandelten Zellen sowohl bei der Kollagen II- als auch bei der GAG-Detektion eine geminderte Syntheseleistung. Diese Reduktion ist bei den nur für einen Tag mit 17β -Estradiol stimulierten Zellaggregaten ebenso nachweisbar wie bei denen der 21tägigen E2-Inkubation. Jedoch ist sie in der d0-1-Gruppe augenscheinlicher, was die Vermutung aufkommen lässt, dass die Chondrogenese-Inhibition durch E2 schon in den ersten 24 Stunden und damit als Hypothese über den schnellen, nicht-genomischen Signalweg eingeleitet wird.

Einen weiteren Unterschied zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Jenei-Lanzl stellten die Kollagen II- Werte unter der E2-Konzentration 10^{-11} M dar, die verglichen mit denen bei 10^{-9} M und 10^{-10} M gefundenen Kollagen II-Werten niedriger waren. Eine zunehmende Inhibition bei abnehmender 17β -Estradiol-Konzentration muss in Betracht gezogen werden und könnte durch weitere Experimente mit noch niedrigeren E2-Konzentrationen untersucht werden. Darüber hinaus kann die allgemein mäßige Chondrogenese die angeführten abweichenden Ergebnisse bedingt oder zumindest

verstärkt haben. Allerdings zeigte sich kein Hinweis auf eine Störung der Aggregat-Kondensation oder eine komplette Unterdrückung der chondrogenen Differenzierung. Somit kann eine vollkommene Unterbindung der Chondrogenese durch 17β -Estradiol ausgeschlossen werden.

Hinzu kommt, dass die Ergebnisse keine statistische Signifikanz zeigten und somit auch keine eindeutige E2-Konzentrationsabhängigkeit der Kollagen II-Produktion aufgezeigt werden konnte. Als verantwortlich hierfür kann der kleine Versuchsumfang von 3 Patienten erwogen werden. Zudem scheint auch das Spenderalter von Relevanz: Auch bei männlichen Spendern variiert der Estradiol-Spiegel altersabhängig, was eine weitere Erklärung für die Inkonstanz der Ergebnisse darstellen könnte.

Yun et al. präsentierten eine Steigerung der Proliferation humaner mesenchymaler Stammzellen durch 17β -Estradiol (Yun, 2009). Dagegen beschrieben Talwar et al. eine durch 17β -Estradiol der Konzentration 10^{-8} M hervorgerufene Reduktion der Chondrozyten-Proliferation und –Reifung, die in einer verminderten Knorpel-Dicke resultierte (Talwar, 2006). Dies bestätigt die von uns gewählte Hemmkonzentration von 10^{-8} M. Allerdings arbeitete die Gruppe um Talwar mit adultem Ratten-Knorpel.

Eine Vielzahl an Studien kommt überein, dass 17β -Estradiol in der Lage ist, multiple Gewebearten über unterschiedliche Mechanismen zu beeinflussen (Roman-Blas, 2009; McMillan, 2006). Die Präsenz von Östrogen-Rezeptoren auf Stammzellen ist mehrmals nachgewiesen worden (Tankó, 2008; Hong, 2004; Jenei-Lanzl, 2010). Die vorliegenden Ergebnisse belegen für unser Modell ebenfalls das Vorhandensein der Rezeptoren ER- α und ER- β in mesenchymalen Stammzellen während der Chondrogenese. Erst durch den Nachweis dieser für den klassischen Weg der Östrogenwirkung essentiellen Strukturen ist eine Versuchsanordnung zum Vergleich mit dem nicht-genomischen Weg legitim. Eine Auswirkung der verschiedenen Hormonkonzentrationen auf die Intensität der Rezeptortranslation konnte nicht aufgezeigt werden.

Die Vermittlung der Estradiol-Effekte über die beiden klassischen intrazellulären Steroidhormon-Rezeptoren- α und - β ist schon seit längerem allgemein akzeptiert (Beato, 2000). Diese liganden-aktivierten intranukleären Rezeptoren fungieren als

Transkriptionsfaktoren und stimulieren so die mRNA-Synthese. Dieser Prozess nimmt eine Zeitspanne von Stunden bis Tage in Anspruch. Nun kommt man in einer wachsenden Anzahl an Studien zu dem Schluss, dass 17 β -Estradiol seine Wirkung auch über nicht-genomische Wege via extrazelluläre Plasmamembran-Rezeptoren entfaltet (McMillan, 2006; Kousteni, 2001). Schon nach wenigen Minuten eintretende Effekte laufen zu schnell ab, als dass sie sich durch RNA-Aktivierung und Protein-Translation erklären ließen (Fatehi-Sedeh, 2004). Die Hypothese einer alleinigen Wirkung von Östrogen durch membranständige Formen der klassischen Rezeptoren muss nach neuesten Erkenntnissen angezweifelt werden (Prossnitz, 2008; Safe, 2008): Dies wirft die Frage auf, ob der membranständige ER dem intrazellulären ER entspricht und wenn dies der Fall sein sollte, ob er dann größere Homologien mit ER α oder ER β aufweist. Fest steht, dass keine dieser beiden ER-Formen ein Transmembran-Protein darstellt (Beato, 2000). Razandi et al. gelang am Tiermodell (chinesischer Hamster) die Detektion von Membran-ER α und -ER β in mit einem Expressionsvektor der betreffenden Rezeptor-cDNA transfizierten Ovarzellen (Razandi, 1999). Dieses Experiment wurde als Beweis dafür angeführt, dass die membranständige und die nukleare Form jedes der beiden Estradiol-Rezeptoren auf das gleiche Transkript gründen und ähnliche Affinitäten zu E2 innehaben.

Im Gegensatz dazu suggerieren die nach wie vor erhaltenen schnellen E2-Antworten bei ER α -Knockout-Mäusen oder bei mit dem Antiöstrogen ICI182,780 behandelten Wildtyp-Mäusen die Existenz eines funktionalen Membran-Östrogen-Rezeptors, der sich von den intrazellulären ER-Formen unterscheidet (Gu, 1999). Zusätzlich fand man bezüglich der nicht-genomischen Wirkmechanismen heraus, dass dabei - vermittelt über intrazelluläre Signaltranslationskaskaden - die Mobilisierung intrazellulären Kalziums (Improta-Brears, 1999), die Stimulation der Adenylatcyclase-Aktivität sowie der NO- und cAMP-Produktion von Bedeutung sind (Brochhausen, 2009; Amin, 1998). Da diese Wirkmechanismen den durch Wachstumsfaktoren induzierten Effekten ähneln, war die Suche nach Membranrezeptoren nahe liegend. Dabei stieß man auf ein Östrogen-bindendes Protein - im Status eines „orphan receptors“ als GPR30 oder auch

GPCR30 betitelt. Zunächst wurde dieses Protein als ein an der Plasmamembran lokalisierter Östrogen-Rezeptor beschrieben. Jedoch fand man GPR30 auch im endoplasmatischen Retikulum in die signalvermittelnde Kalziumausschüttung involviert (Levin, 2008). Dieser G-Protein gekoppelte Rezeptor wurde bereits in mehreren menschlichen Gewebearten – darunter auch Knorpel - gefunden (Hasbi, 2005; Hewitt, 2005). Filardo konnte die Involvierung von GPR30 in die E2-vermittelte ERK-Aktivierung in Zellen ohne klassische ERs demonstrieren (Filardo, 2000). Der Familie der G Protein-gekoppelten Transmembranrezeptoren zugehörig, vermittelt er sowohl E2-abhängige Kinasen-Aktivierung als auch genomische Effekte wie die Transkription (Prossnitz, 2008). Die Lokalisation des Transmembran-Östrogen-Rezeptors GPR30 an der Plasmamembran und die Bedeutung für die chondrale Differenzierung mesenchymaler Stammzellen konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Jenei-Lanzl, 2010). Des Weiteren kamen verschiedene Autoren zu der Übereinkunft, dass GPR30 mit einer Vielzahl anderer Signalmolekülen - darunter auch membranständige ERs - in Zusammenhang zu bringen ist (Vivacqua, 2005) und dass es sich bei GPR30 somit um keinen eigenständigen ER handelt, sondern dass GPR30 in Abhängigkeit anderer Rezeptoren arbeitet.

Undurchsichtig blieb bisher in welchem Ausmaß diese beiden angeführten Wege jeweils für die E2-Effekte verantwortlich sind und inwieweit sie sich gegenseitig beeinflussen. Eine klare Trennung der beiden Wirkmechanismen ist nicht möglich, da fast alle Hormone in Abhängigkeit des angesprochenen Rezeptors sowohl die schnelle Signaltransduktion als auch die Gen-Transkription initiieren (Couse, 1999). Eine Unterscheidung wird noch zusätzlich dadurch erschwert, dass die nichtgenomischen Effekte teilweise auch mehr Zeit in Anspruch nehmen können (Prossnitz, 2008). Eine Zusammenarbeit der schnellen Signaltransduktion mit dem nuklearen Pool an klassischen Steroidrezeptoren wurde bereits beschrieben (Levin, 2008). Jedoch bleibt bisher unklar, welche Mechanismen genau aus der Interaktion der klassischen ER- α und - β mit z. B. GPR30 resultieren und welche auch in Abwesenheit des jeweils anderen Rezeptortyps stattfinden können. Auch soll die rasche Signalvermittlung einen direkten Einfluss auf

die Funktion der klassischen ERs nehmen können (Prossnitz, 2008). Trotz dieser Verwebung der Wirkmechanismen, konnten wir in unseren ergebnisorientierten Versuchsreihen eine dosisabhängige Chondrogenese-Hemmung durch 17 β -Estradiol wie auch eine E2-Abhängigkeit der MAPK-Synthese feststellen. Der MAPK-Pathway wurde in unseren Experimenten stellvertretend für die schnelle Signaltransduktion untersucht, da die MAPK hauptsächlich dem nicht-genomischen Weg angehören (McMillan, 2006). Einige Autoren belegen die Beteiligung der MAPK an der nicht-genomischen Wirkung von Sexualhormonen (Prossnitz, 2008; Fatehi-Sedeh, 2004). Die vorgestellten Ergebnisse zeigen eine Beeinflussung der ECM-Syntheseleistung durch kurzzeitige (1 Tag) Einwirkung von Östrogen. Vor diesem Hintergrund ist es nahe liegend, die MAPK- Aktivierung nach einer kurzen, im Bereich von Stunden liegenden Einwirkzeit zu untersuchen. Aus diesem Grund und weil in der Literatur bereits ein Aktivierungsmaximum bei 90 min beschrieben wurde (Fatehi-Sedeh, 2004; JL Wang, 2007), fiel die Wahl der Inkubationszeiträume auf 9 und 90 Minuten. Somit wurde der Einfluss verschiedener 17 β -Estradiol-Konzentrationen nach 9- und 90-minütiger Inkubationszeit auf den Phosphorylierungs- und damit Aktivierungsstatus der MAP-Kinasen untersucht. Dabei zeigte sich ein Signalintensitätsunterschied zwischen der E2-freien Kontrollgruppe und den E2-stimulierten Gruppen, was die Hypothese einer Involvierung der MAPK bestätigt. Diese Erkenntnis deckt sich auch mit den Resultaten anderer Autoren, die zu dem Schluss kamen, dass der Knorpelabbau durch MMPs über den MAP-Kinase-Pathway induziert wird: Sondergaard et al. gelang es in einer aktuellen Studie mittels ERK- und p38-Inhibitoren den proteolytischen Knorpelabbau durch Matrix Metalloproteasen aufzuhalten, was einen Rückschluss auf eine maßgebliche Beteiligung dieser beiden MAPK bei der Knorpeldegradierung erlaubt (Sondergaard, 2009). Dieses Resultat liefert eine mögliche Verbindung zwischen dem erhöhten MAPK-Aktivierungsstatus und der im Kollagen II- und GAG-Essay gezeigten Chondrogenese-Inhibition unter der 17 β -Estradiol-Konzentration 10⁻⁸ M. Allerdings konnte ein Zusammenhang zwischen einer durch MMPs induzierten Zytokinausschüttung und einer verminderter ECM-Synthese bisher nur im reifen Knorpel nachgewiesen werden.

Darüber hinaus stellte sich ein Aktivierungsmaximum bei der E2-Konzentration 10^{-8} M sowie ein parabelförmig anmutendes Aktivierungsmuster mit ansteigender Signalintensität von 10^{-7} M zum Maximum bei 10^{-8} M und anschließendem Intensitätsabfall von 10^{-9} bis 10^{-11} M dar. Eine dosisabhängige Östrogenantwort wurde auch von anderen Autoren beschrieben: Demnach manifestierten sich physiologische E2-Dosen als knorpelprotektiv, während höhere Konzentrationen den Knorpelabbau förderten (Richette, 2003).

Nachdem die Unterscheidung zwischen 9 und 90 min dauernder 17β -Estradiol-Einwirkzeit in den Untersuchungen der Konzentrationsabhängigkeit bereits Hinweise auf eine Zeitabhängigkeit der Aktivierung geliefert hatte, wurde der zeitliche Verlauf des Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinasen nach Estradiolzugabe dokumentiert. Hier zeigte sich, dass insbesondere die Zeiträume ab 60 min eine deutliche Aktivierungszunahme verzeichneten. Im Nachhinein ist die Wahl des längsten Beobachtungszeitraums bei 240 min kritisch zu sehen. Das Weiterstecken des zeitlichen Rahmens hätte möglicherweise eine Wiederabnahme des Aktivierungsniveaus belegt.

Um die potentiellen Effekte auf die Plasmamembran zu beschränken, wurde E2 mit BSA konjugiert, ein Komplex ohne Möglichkeit zur Durchdringung der äußeren Zellmembran. Damit erhoffte man sich eine eindeutigere Differenzierung zwischen den extra- und intrazellulär lokalisierten E2-Rezeptoren und ihrer jeweiligen Effekte. Allerdings sollten die Ergebnisse einer vorsichtigen Interpretation zugeführt werden, da die Möglichkeit der Abdissoziation des Hormons bereits beschrieben wurde (Stavis, 1999). Diese Loslösung könnte auch als Grund für die stärkere Phosphorylierung der MAPK nach 90minütiger E2-BSA-Stimulation angeführt werden. Hinzu kommt, dass E2-BSA möglicherweise von Zellen aufgenommen und degradiert wird, was die Bildung von E2-Pools innerhalb der Zellen zu Folge hat. Außerdem steht die Frage zur Debatte, ob E2-BSA wirklich die gleichen Auswirkungen erreicht wie freies E2 (Prossnitz, 2008; Stevis, 1999).

Da die Quantität und die Anfälligkeit des Konjugats bezüglich Dissoziation nicht vorhersehbar sind, wurde E2-BSA frisch vor den Experimenten angesetzt, um unerwünschte Einfrier-Auftau-Prozeduren zu vermeiden.

Ebenfalls zur weiteren Differenzierung der nicht-genomischen von den klassisch-genomischen E2-Wirkweisen sollte ICI182,780 dienen, ein spezifischer ER-Antagonist, der die Dimerisierung der ERs verhindert. In den Western Blot-Experimenten führten allerdings sowohl die 9- als auch in höherem Ausmaß die 90minütige Inkubation zu einer verstärkten Phosphorylierung im Vergleich zu der östrogenfreien Kontrollgruppe. Für diese mangelnde Inhibition können mehrere Hypothesen aufgestellt werden: Zum einen besteht die Möglichkeit der insuffizienten Inhibition und/oder Degradation der ERs. Zum anderen ist es nahe liegend, dass die Signaltransduktion über andere, nicht blockierte E2-Rezeptoren von statten gegangen ist und dass dabei ICI182,780 als Agonist dieser nicht-klassischen ERs gewirkt hat (Prossnitz, 2008). Im Rahmen dieser Versuchsreihe würde eine agonistische Wirkung von ICI182,780 am extrazellulären Rezeptor GPR30 die erhöhte MAPK-Aktivierung nach 9 und 90 Minuten ICI182,780-Inkubation erklären und ebenso für eine membranvermittelte E2-Wirkung sprechen. Als Bestätigung dieser Aussage kann gewertet werden, dass auch andere Autoren die Phosphorylierung von ERK1/2 sowie eine Kalziummobilisierung als Reaktion auf Kurzzeitbehandlung mit ICI182,780 beschreiben (Sukocheva, 2003).

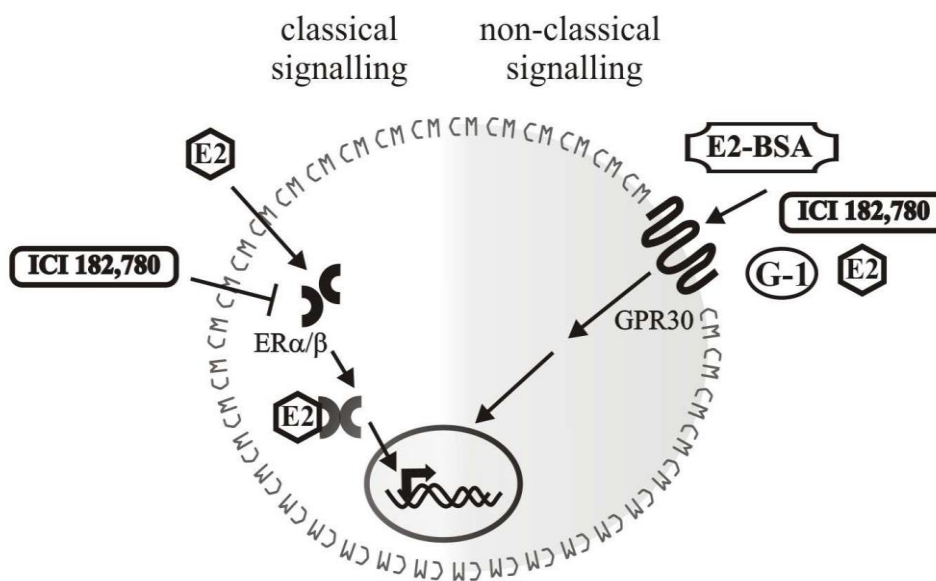


Abbildung 4-1: 17β-Estradiol-abhängige Chondrogenese-Hemmung über den nicht-klassischen Weg, vermittelt über den membranständigen Rezeptor GPR30, welcher von E2-BSA und ICI182,780 aktiviert wird (grauer Bereich der Graphik). Im weißen Bereich wird der klassische ERα/β-Wirkmechanismus dargestellt. (modifiziert nach Jenei-Lanzl, 2010)

In Conclusio der MAPK-Experimente können mehrere Aussagen getroffen werden: Zum einen werden die mitogen activated protein kinases durch 17β-Estradiol aktiviert, wobei sich sowohl eine Konzentrations- als auch eine Zeitabhängigkeit abzeichnet. Auch eine membranvermittelte MAPK-Aktivierung konnte belegt werden. Mit diesen Ergebnissen mehren sich die Hinweise darauf, dass 17β-Estradiol seine Wirkung über den MAPK-Pathway vermittelt. Allerdings ist diese direkte und eindeutige Schlussfolgerung noch nicht in ihrer Absolutheit zulässig, da im Rahmen der vorliegenden Arbeit lediglich gezeigt wurde, dass E2 einen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus der MAPK auf der Proteinexpressionsebene innehat.

Für diese Arbeit kamen via Beckenkampunktion gewonnene humane mesenchymale Stammzellen von männlichen Spendern zum Einsatz. Diese gehören einer Population multipotenter Zellen an, die in der Lage sind, zu proliferieren und sich in eine Vielzahl

an mesodermalen Gewebearten wie Knorpel, Knochen, Muskel, Bänder, Sehnen oder auch Fett zu entwickeln (Johnstone, 1998). Allerdings birgt der Einsatz menschlicher Spenderzellen die Gefahr einer hohen Variabilität der Ergebnisse und damit eines Verlustes von signifikanten Ergebnissen. Die weite Streuung der ELISA-Daten lässt sich durch das verwendete Modell erklären. Eine Alternative zu unserem Modell ist der Einsatz von Zellklonen. Ein Modell, was eine kohärente Ergebnisqualität verspricht, sich jedoch im Vergleich zu unseren Zellen wieder einen Schritt von der klinischen Situation entfernt. Hinzu kommt ganz pragmatisch zurzeit das Fehlen eines kommerziell erhältlichen Klones für unser Knorpel-Modell.

Eine weitere Möglichkeit zur Schärfung der Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen ist die Steigerung der Versuchsdurchläufe. Letztendlich blieb zur quantitativen Bestimmung der Syntheseparameter nur eine Spenderzahl von drei übrig. Dieses Problem war bereits bei der Versuchsplanung offensichtlich. Als Kernziel war die Analyse der Signalwege festgelegt worden, so dass bei der nur begrenzt vorliegenden Spenderzellanzahl die histologischen und quantitativen Ergebnisse aus der Zellkultur als Bestätigungsexperimente angeführt wurden.

Die Versuchsreihen zum intrazellulären Signaling zeigten bei allen Wiederholungen konstante Ergebnisse, so dass wir bei der semiquantitativen Auswertung dieser Experimente keine Probleme mit unserem Modell sehen.

Die einzelnen Parameter des Versuchsaufbaus müssen detailliert betrachtet und mit denen anderer Studien verglichen werden: So besteht wohl eine Geschlechtsabhängigkeit der Zellen: McMillan et al. beschrieben eine Beeinflussung der MAPK-Aktivität durch 17β -Estradiol nur bei weiblichen Zellen (McMillan, 2006). Dies konnte in unseren Experimenten mit ausschließlich männlichen Spenderzellen nicht bestätigt werden. Allerdings arbeiteten McMillan et al. mit Wachstumsfugen-Chondrozyten der Ratte.

Zellen von männlichen Spendern wurden gewählt um eine physiologisch konstante hormonelle Ausgangskonzentration zu erhalten. In anderen Studien unserer Arbeitsgruppe ist allerdings zwischenzeitlich belegt worden, dass bei männlichen Spenderzellen das Alter des Spenders eine weitaus einflussreichere Rolle spielt, als dies bisher

angenommen wurde. Selbst beim männlichen Geschlecht verändern sich die E2-Plasmakonzentrationen mit dem Alter. Weiterführende Studien werden diesen Zusammenhang berücksichtigen müssen. Hierzu konform präsentierten Nasatzky et al. eine E2-Antwort der sich in Differenzierung befindlichen Ratten-Chondrozyten, die sich als abhängig vom Reifestadium derselben erwies (Nasatzky, 1993).

Das in dieser Arbeit ausschließlich eingesetzte 17β -Estradiol ist das Östrogen mit der größten quantitativen Bedeutung im menschlichen Körper. Die verwendeten Östrogenkonzentrationen richteten sich nach den physiologisch/pharmakologisch vorliegenden Werten. Die verwendete Konzentrationspanne entspricht der weiblichen physiologischen E2-Plasma-Konzentration, welche im nM-Bereich rangiert: In der Follikelphase sowie der Lutealphase werden durchschnittlich Werte um 10^{-10} M und in der Zyklusmitte wird dann ein Peak bei ca. 10^{-9} M gemessen. Postmenopausal fällt die E2-Konzentration auf 10^{-10} M und weniger. Während einer Schwangerschaft rangiert der E2-Spiegel zwischen 10^{-9} und 6×10^{-8} M. Die im Rahmen der durchgeführten Experimente gefundene höchste Chondrogenese-Hemmkonzentration von 10^{-8} M wird abgesehen von der Schwangerschaftsdauer pharmakologisch unter Hormonersatztherapie erreicht.

Es muss davor gewarnt werden, die E2-Plasmakonzentrationen als absoluten, im ganzen Körper gleichmäßig vorliegenden Wert zu sehen. Obwohl Östrogen vornehmlich in den Ovarien produziert wird, beschreiben neuere Studien eine Vielzahl an zusätzlichen E2-Syntheseorten im ganzen Körper. Folglich muss mit der Existenz lokaler Effekte gerechnet werden. Ein Beispiel stellt das Brustgewebe postmenopausaler Frauen dar, in welchem 10 - 20fach höhere Konzentrationen als im Plasma gemessen wurden. Gleiches gilt für die Synovialflüssigkeit von Gelenken. Dieser Befund lässt entweder an eine lokale Produktion oder an eine E2-Kumulierung denken. (Prossnitz, 2008). Auch in unserem Versuchsaufbau ist trotz der Dreidimensionalität der Pellet-Kultur eine Hormonkumulation außerhalb bzw. eine niedrigere E2-Konzentration innerhalb des Pellets nicht ganz ausgeschlossen: Es bleibt unklar, ob und in welcher Konzentration Hormone zum Ende der Kulturdauer in das Innere der von extrazellulä-

rer Substanz dominierten Gebilde diffundieren können. Zum anderen ist die Reaktionsfähigkeit hinsichtlich der Syntheseleistung bei den tief im Netzwerk einliegenden Chondrozyten ebenfalls aufgrund der Enge des bereits gebildeten Geflechts limitiert. Somit wurde eine Untersuchung mit ultrakurzer Einwirkzeit gewählt. Die prinzipielle Rechtfertigung des 3D-Modells liegt in der Analogie zur Dreidimensionalität des Gelenkknorpels *in vivo*. Als Alternativ-Modell zu der hier verwendeten Pellet-Kultur werden in der aktuellen Literatur 3D-Trägermatrices aus Fibrin und Polyurethan diskutiert, die ähnliche Ergebnisse liefern sollen wie die Aggregat-Kultur (Li, 2009). Hierbei ist jedoch die Interaktion mit der Trägermatrix und die Auswirkung auf die Zellentwicklung nicht abschließend geklärt und die Ergebnisse sind nur spezifisch für das jeweils verwendete Konstrukt zu bewerten.

Um konstante und möglichst exakte Hormon-Konzentrationen für die Estradiol-Inkubation herstellen zu können, mussten Verfälschungen vermieden werden. Da dem häufig als pH-Indikator gebräuchlichen Zellkulturmediumsinhaltstoff Phenolrot eine östrogene Wirkung nachgesagt wird (Berthois, 1986), schuf man unter Verwendung eines phenolrotfreien Proliferationsmediums östrogenarme Wachstumsbedingungen. Nicht vermeiden ließ sich der Einsatz eines anderen Glucocorticoids: Dexamethason ist als Mediumzusatz für die chondrogene Differenzierung notwendig, da ohne Dexamethason keine verlässliche Syntheseleistung sichergestellt werden kann (Angele, 1999, Ahmed, 2002). Die Rolle von Glucocorticoiden in den früheren Stadien der Entstehung des Knorpels wird bereits seit mehreren Jahrzehnten untersucht (Kato, 1985). Seitdem wird Dexamethason als einer der wichtigsten Differenzierungsfaktoren für die Chondrogenese und Osteogenese angesehen und experimentell eingesetzt (Kim, 2005). So wurde beobachtet, dass die Sox9-Expression unter Zugabe von Dexamethason hochreguliert wird, was als Voraussetzung für die Chondrogenese gilt (Sekiya, 2000). Der Einfluss von Dexamethason ist hierbei sowohl von der Hormonkonzentration (Behrens, 1975) als auch vom Grad der Differenzierung der Zellen abhängig (Ahmed, 2002). Aus den genannten stabilisierenden Effekten wurde Dexamethason in allen experimentellen Gruppen mitgeführt. Durch die Konstanz der Zugabe in alle Gruppen lässt sich ein

überlagernder Effekt durch beispielsweise unspezifische Dexamethasonbindung an die spezifischen Östrogenrezeptoren zumindest für alle Gruppen angleichen. Ein vollständig Dexamethason-freier Versuchsansatz ist für zukünftige Experimente wünschenswert, ein Surrogat ist noch nicht gefunden.

5 **Ausblick**

Der Einfluss von 17β -Estradiol auf die Differenzierung von Zellen mit chondrogenem Potenzial im Hinblick auf eine Qualitätsverbesserung des Tissue Engineerings ist bisher nur unzureichend erforscht. Weitere Studien zu den E2-Wirkmechanismen könnten neue Perspektiven in der therapeutischen regenerativen Medizin eröffnen: Dabei ist es von vorrangigem Interesse, die wesentlichen Stoffwechselvorgänge im Knorpel zu studieren sowie ein grundlegendes Verständnis für die Chondrogenese-Signalmechanismen und für das funktionelle Potenzial der Zellen zu erwerben. So könnte beispielsweise eine vergleichende Studie der Reaktionen von hMSCs weiblicher und männlicher Spender zu einer geschlechtsabhängigen Modifizierung bei der regenerativen Knorpelherstellung führen.

Ebenso birgt der GPR30-Rezeptor Forschungspotenzial: Da bereits beschrieben wurde, dass die inhibitorischen Effekte des 17β -Estradiols über diesen membranständigen G-Protein gekoppelten Transmembran-Rezeptor vermittelt werden, könnte der Einsatz spezifischer GPR30-Antagonisten der Chondrogenesehemmung entgegenwirken.

Nach weiterer Klärung der jeweiligen Rolle der klassischen Östrogen-Rezeptoren $ER\alpha$ und $ER\beta$ wäre die spezifische An- bzw. Abschaltung eines der Rezeptor-Typen erstrebenswert, um unerwünschte Nebenwirkungen der Östrogensersatztherapie zu reduzieren.

Hinsichtlich des Einflusses des 17β -Estradiols auf die Chondrogenese sind weitere Verlaufsbeobachtungen von größter Bedeutung. Zwar ist ein erster Beleg für die supprimierende E2-Wirkung geliefert, aber davon ausgehend ist es nicht möglich, einen einzelnen Signaltransduktionsweg mit Sicherheit als für diese Inhibition allein verantwortlich zu nennen. So könnte z. B. eine PCR-Untersuchung des chondrogenen Marker-Gens Sox9 Veränderungen auch auf dem Transkriptionsniveau belegen. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass Sox9 eine Reihe von knorpelassoziierten Zielgenen aktiviert. Während der Embryogenese wird Sox9 in mesenchymalen Knorpelvorläuferzellen und reifen Knorpel-elementen mit Kollagen II koexprimiert (Ng,

1999). Mittels PCR gelänge es zusätzliche Informationen über die molekulare Regulation der chondrogenen Zelldifferenzierung zu gewinnen.

Weitere Experimente sind auch deshalb erstrebenswert, um die komplexen Interaktionen innerhalb des nicht-genomischen und genomischen Pathways und zwischen diesen beiden Wegen zu beleuchten. Dabei könnten spezifische MAPK-Blocker helfen, die eine klarere funktionelle Zuteilung der einzelnen MAPK erlauben. Als problematisch könnte sich beim Einsatz dieser Inhibitoren allerdings die Sicherung des Zellüberlebens gestalten. Da jede einzelne MAP-Kinase eine Vielzahl von Funktionen ausübt und somit auch essentielle Bedeutung für das Zellüberleben besitzt, besteht bei ihrer Blockierung die Gefahr der Apoptose.

6 Zusammenfassung

Schäden und Verlust des Gelenkknorpels stellen eine immense Belastung für den individuellen Patienten und für die Volkswirtschaft dar. Das moderne Tissue Engineering verspricht eine zukunftsweisende Behandlung für fokale, meist traumatisch entstandene Knorpeldefekte zu werden. Obwohl das Hormonmilieu sowohl bei Spen-derzellentnahme als auch bei Transplantation des TE-Konstruktes determiniert ist, sind Studien zur Beeinflussung der Chondrogeneseleistung rar und der zugrundeliegende intrazelluläre Signalweg noch unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es, Kurzzeitwirkungen von 17β -Estradiol auf die Chondrogenese humaner mesenchymaler Stammzellen zu untersuchen und den MAPK pathway als möglichen Signalweg zu analysieren.

Die Syntheseleistung konnte durch eine nur eintägige Kultivierung mit 17β -Estradiol beeinflusst werden. Eine tendenzielle Konzentrationsabhängigkeit wurde beobachtet, jedoch ohne statistische Signifikanz. In der neu etablierten Western Blot-Analyse konnte die Aktivierung der MAPK (p38, ERK) nachgewiesen werden. Diese war einwirkzeit- und konzentrationsabhängig. Ein alleiniger Effekt durch membranständige Rezeptoren konnte nicht bewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit belegt die Hormonsensitivität des verwendeten Modells auch für kurze Einwirkzeiten. Die Aktivierung der MAPK ist ein erster Schritt zur Entschlüsselung des Signalweggeflechts.

Die Ergebnisse weisen auf das Potenzial der Sexualhormone beim modernen Tissue Engineering hin und rücken den Hormonstatus zukünftiger Patienten in den Fokus.

Literaturverzeichnis

- Ahmed S, Tucker P, Short-term effects on linear growth and bone turnover in children randomized to receive prednisolone or dexamethasone, *Clin Endocrinol*, 57(2): 185-91, 2002
- Aigner T, Zien A, Gehrsitz A, Gebhard P, McKenna L, Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology, *Arthritis Rheum*, 44: 2777-2789, 2001
- Amin A, Abramson S, The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis, *Curr Opin Rheumatol*, 10(3): 263-268, 1998
- Angele P, Kujat R, Nerlich M, Yoo J, Goldberg V, Johnstone B, Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge, *Tissue Eng.*, 5(6):545-54, 1999
- Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM, Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components, *Exp Cell Res*, 268:189-200, 2001
- Beato M, Klug J, Steroid hormone receptors: an update, *Hum Reprod Update*, 6: 225-236, 2000
- Behrens F, Shepard N, Mitchell N, Alterations of rabbit articular cartilage by intraarticular injections of glucocorticoids, *J Bone Joint Surg*, 57(1): 70-76, 1975
- Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture, *PNAS*, 8: 2496-2500, 1986

- Bertram S, Die Rolle von VEGF in der Entwicklung der experimentell induzierten Arthrose im Kaninchenmodell, 2005
- Brochhausen C, Lehmann M, Zehbe R, Watzer B, Grad S, Meurer A, Kirkpatrick CJ, Tissue engineering of cartilage and bone. Growth factors and signalling molecules, Der Orthopäde, Okt 2009
- Brunner H-J, Quantitative Nachweismethoden für Proteine und DNA aus gentechnisch veränderten Organismen in Lebensmitteln, 2002
- Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ, Articular cartilage and osteoarthritis. Instr Course Lect., 54:465-80, 2005
- Buckwalter JA, Martin JA, Brown TD, Perspectives on chondrocyte mechanobiology and osteoarthritis, Biorheology. 43(3-4):603-9, 2006
- Burr DB, Schaffler MB, The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthritis: quantitative microscopic evidence, Microsc Res Tech, 37: 343-57, 1997
- Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE, Matrix metalloproteinases: role in arthritis, Front Biosci, 1:529-43, 2006
- Caplan AI, Mesenchymal stem cells, J Orthop Res, 9:641-50, 1991
- Cato AC, Nestl A, Mink S, Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways, Sci STKE, re9, 2002
- Cecil RL, Archer BH, Arthritis of the menopause, J Am Med Assoc, 84: 75-9, 1925
- Celsus, De Medicina (In: Spencer WG (ed), Celsus De Medicina, Heinemann-Harvard University Press, London-Cambridge, 1: 455, 1935)

- Chang L, Karin M, Mammalian MAP kinase signalling cascades, *Nature*, 410: 37-40, 2001
- Charcot JM, Maladies de vieillards (In: Bourneville DM (ed), JM Charcot oeuvres completes, Bureaux du Progres medical, Paris, Tome VII: 246-7, 1890)
- Couse JF, KorachKS, Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocr. Rev.*, 20: 358-417, 1999
- Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS, Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout-mouse, *Endocrinology*, 138: 4613-4621, 1997
- Czyz J, Wiese C, Rolletschek A, Blyszczuk P, Cross M, Wobus AM, Potential of embryonic and adult stem cells in vitro, *J Biol Chem*, 384:1391-409, 2003
- Da Silva JA, Colville-Nash P, Spector TD, Scott DL, Willaughby DA, Inflammation-induced cartilage degradation in female rodents. Protective role of sex hormones, *Arthritis Rheum*, 36: 1007-13, 1993
- Denko CW, Boja B, Moskowitz RW, Growth promoting peptides in osteoarthritis: insulin, IGF-1, growth hormone, *J Rheumatol* 17(9): 1217-1221, 1990
- Falkenstein E, Tillmann H, Christ M, Feuring M, Wehling M, Multiple actions of steroid hormones - a focus on rapid nongenomic effects, *Pharmacol Rev*, 52: 513-555, 2000
- Fatehi-Sedeh S, McMillan J, Safavynia S, Boyan BD, Schwartz Z, Estrogen regulates MAP Kinase by a non-ER mechanism, *Mineralized Tissues: Hormones and Growth Factors*, 3, 2004

- Felson DT, Nevitt MC, The effects of estrogen on osteoarthritis, *Curr.Opin.Rheumatol.*, 10: 269-72, 1998
- Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology, *Biorheology*, 39: 237 – 246, 2002
- Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr., Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF, *Mol. Endocrinol.*, 14: 1649-60, 2000
- Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS, Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype, *Endocrinology*, 144: 4562-74, 2003
- Friederich HF, König U, Petsinis T, Arthroscopy in knee osteoarthritis, *Journal of Bone and Joint Surgery*, 84: 352, 2002
- Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van denBerg WB, Stimulation of articular cartilage repair in established arthritis by local administration of TGF β into murine knee joints, *Lab Invest*, 78(2): 133-142, 1998
- Goessler UR, Bieback K, Bugert P, Naim R, Schafer C, Sadick H, Hormann K, Riedel F, Human chondrocytes differentially express matrix modulators during in vitro expansion for tissue engineering, *Int J Mol Med*, 16:509-15, 2005
- Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Sadick H, Baisch A, Hormann K and Riedel F, In vitro analysis of differential expression of collagens, integrins, and growth factors in cultured human chondrocytes, *Otolaryngol Head Neck Surg*, 134:510-5, 2006
- Goldring MB, The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models, *Connect Tissue Res*, 40: 1 - 11, 1999

- Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K, The control of chondrogenesis, J. Cell Biochem., 97:33-44, 2006
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos B, Chambon P, Human estrogen receptor cDNA, sequence, expression and homology to v-erb-a, Nature, 320: 134-39, 1986
- Gu Q, Korach K, Moss RL, Rapid Action of 17 β -Estradiol on Kainate-Induced Currents in Hippocampal Neurons Lacking Intracellular Estrogen Receptors, Endocrinology, 140 (2): 660-666, 1999
- Hall J, Couse J, Korach K, The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling, J Biol Chem, 276: 36869-36872, 2001
- Hamerman D, The biology of osteoarthritis, N Engl J Med, 320: 1322-330, 1989
- Hangody L, Fules P, Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience, J Bone Joint Surg, 2:25-32, 2003
- Hasbi A, O'Dowd BF, George SR, A G Protein-Coupled Receptor For Estrogen: The EndOf The Search?, Mol. Intervent, 5: 158-161, 2005
- Hashimoto S, Creighton-Achermann L, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M, Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage 10(3): 180-187, 2002
- Henderson BE, Ross R, Bernstein L, Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture, Cancer Res, 48: 246-253, 1988
- Heng, BC, Cao T, Lee EH, Directing Stem Cell Differentiation into the Chondrogenic Lineage In Vitro, Stem Cells, 22:1152-1167, 2004

- Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA, Castañeda S, Jimenez SA, Primary osteoarthritis no longer primary: three subsets with distinct etiological, clinical, and therapeutic characteristics, *Semin Arthritis Rheum.*, 39(2):71-80, 2009
- Hewitt SC, Deroo BJ, Korach KS, Signal Transduction: A New Mediator for an Old Hormone?, *Science*, 307, 2005
- Hippokrates, Über Frauenkrankheiten (In: Grensemann H (ed), *Hippokratische Gynäkologie*, Steiner, Wiesbaden, 131, 1982)
- Holzer G, Hormonsubstitutionstherapie und ihre Wirkung auf die Gelenke, *Journal für Menopause*, 7(3): 14-19, 2000
- Hong SH, Nah HY, Lee YJ, Lee JW, Park JH, Kim SJ, Lee JB, Yoon HS, Kim CH, Expression of estrogen receptor- α and - β , glucocorticoid receptor, and progesterone receptor genes in human embryonic stem cells and embryoid bodies. *Mol Cells*, 18: 320-325, 2004
- Horowitz MC, Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects, *Science*, 260: 626-7, 1993
- Hunziker EB, Quinn TM, Hauselmann HJ, Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage, *Osteoarthritis Cartilage*, 10:564-72, 2002
- Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, York JD, Meyer T, McDonnell DP, Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 4686-4691, 1999
- Jenei-Lanzl Z, Straub RH, Dienstknecht T, Huber M, Hager M, Grässel S, Kujat R, Angele MK, Nerlich M, Angele P, Estradiol inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via non-classical signalling, *Arthritis Rheum.*, 2010

- Jensen EV, Jacobson HI, Basic guides to the mechanism of estrogen action, *Rec Prog Horm Res*, 18: 387-414, 1962
- JL Wang, RC Chan, HH Cheng, CJ Huang, YC Lu, IS Chen, SI Liu, SS Hsu, HT Chang, JK Huang, JS Chen, CM Ho, CR Jan, Short waves-induced enhancement of proliferation of human chondrocytes: Involvement of extracellular signal-regulated MAP-Kinase (ERK), *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34: 581-585, 2007
- Johnson LL, Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review, *Clin Orthop Relat Res*, 306-17, 2001
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU, In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells, *Exp Cell Res*, 238: 265-72, 1998
- Kato Y, Gospodarowicz D, Stimulation by glucocorticoid of the synthesis of cartilage-matrix proteoglycans produced by rabbit costal chondrocytes in vitro, *J Biol Chem*, 260: 2364-73, 1985
- Kim H, Suh H, Jo SA, Kim HW, Lee JM, Kim EH, Reinwald Y, Park SH, Min BH, Jo I, In vivo bone formation by human marrow stromal cells in biodegradable scaffolds that release dexamethasone and ascorbate-2-phosphate, *Biochem Biophys Res Commun*, 332: 1053-60, 2005
- Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC, Nongenotropic, Sex-Nonspecific Signaling through the Estrogen or Androgen Receptors Dissociation from Transcriptional Activity, *Cell*, 104: 719-730, 2001
- Lange C, Schroeder J, Stute N, Lioznov MV, Zander AR, High-potential human mesenchymal stem cells, *Stem Cells Dev*, 14:70-80, 2005

- Lavoie J, L'Allemain G, Brunet A, Müller R, Pouyssegur J, Cyclin D1 Expression is regulated positively by the p42/p44 MAPK and negatively by the p38/HOG MAPK pathway, *J. Biol. Chem.* 271: 20608-20616, 1996
- Lee JW, Kim YH, Kim SH, Han SH, Hahn SB, Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications, *Yonsei Med J*, 30:45 Suppl:41-47, 2004
- Lefebvre V, Smits P, Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation, *Birth Defects Res C Embryo Today*, 75:200-12, 2005
- Levin ER, Rapid signaling by steroid receptors, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295: R1425-R1430, 2008
- Li Z, Kupcsik L, Yao SJ, Alini M, Stoddart MJ, Chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cells in fibrin-polyurethane composites, *Tissue Eng Part A*, 15(7): 1729-37, 2009
- Löffler G, Basiswissen Biochemie, 6. Auflage, Springer Verlag, 2004
- Lösel R, Wehling M, Nongenomic actions of steroid hormones, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 46–56, 2003
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275, 1951
- Manavathi B, Kumar R, Steering Estrogen Signals From the Plasma Membrane to the Nucleus: Two Sides of the Coin, *J Cell Physiol*, 207: 594–604, 2006
- Marlovits S, Kutscha-Lissberg F, Aldrian S, Resinger C, Singer P, Zeller P, Vécsei V, Autologe Chondrozytentransplantation zur Behandlung von Knorpeldefekten des Kniegelenks, *Der Radiologe*, 44 (8): 763-72, 2004

- Marshall CJ, Specificity of receptor tyrosine kinase signalling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation, *Cell*, 80: 179-185
- Martel-Pelletier J, Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 6: 374-376, 1996
- McMillan, Fatehi-Sedeh, Sylvia VL, Bingham V, Zhong M, Boyan BD, Schwartz Z, Sex-specific regulation of growth plate chondrocytes by estrogen is via multiple MAP kinase signaling pathways, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763: 381-392, 2006
- McQuillan DJ, Handley CJ, Robinson HC, Control of proteoglycan biosynthesis. Further studies on the effect of serum on cultured bovine articular cartilage, *Biochem. J.*, 237(3): 741-747, 1986
- McQuillan DJ, Handley CJ, Campbell MA, et al., Stimulation of proteoglycan synthesis by serum and IGF-1 in cultured bovine articular cartilage, *Biochem J* 240(2): 423-430, 1986
- Ng KP, Datuin JP, Bern HA, Effects of estrogens in vitro and in vivo on cartilage growth in the tilapia, *Gen Comp Endocrinol*, 121: 295-304, 2001
- Ng MC, Harper RP, Le CT, Wong BS, Effects of estrogen on the condylar cartilage of the rat mandible in organ culture, *J Oral Maxillofac Surg*, 60(1): 10-15, 2002
- OrAhmed S, Tucker P, Short-term effects on linear growth and bone turnover in children randomized to receive prednisolone or dexamethasone, *Clin Endocrinol*, 57(2): 185-91, 2002
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA, Mechanisms of Estrogen Action, *Physiol. Rev*, 81: 1535-1565, 2001
- Osborne CK, Schiff R, Fuqua SA, Shou J, Estrogen Receptor: Current understanding of its activation and modulation, *Clin Cancer Res*, 7: 4338-4342, 2001

- Osborn KD, Trippel SB, Mankin HJ, Growth factor stimulation of adult articular cartilage. J Orthop Res 7(1): 35-42, 1989
- Pfander D, Körtje D, Zimmermann R, Weseloh G, Kirsch T, Gesslein M, Cramer T, Swoboda B, Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints, Ann Rheum Dis 60(11): 1070-1073, 2001
- Pietras RJ, Szego CM, Endometrial cell calcium and oestrogen action, Nature, 253: 357-359, 1975
- Poole AR, Rosenberg LC, Reiner A, Ionescu M, Bogoch E, Roughley PJ, Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage, J Orthop Res, 14:681-89, 1996
- Prossnitz E, Arterburn J, Smith H, Oprea T, Sklar L, Hathaway H, Estrogen Signaling through the Transmembrane G Protein-Coupled Receptor GPR30, Annu. Rev. Physiol., 70:165-190, 2008
- Pullig O, Pfander D, Swoboda B, Molekulare Grundlagen der Arthroseinduktion und -progression, Der Orthopäde 30:825-33, 2001
- Qi M, Elion EA, MAP kinase pathways, Journal of Cell Science, 118: 3569-3572, 2005
- Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER, Cell Membrane and Nuclear Estrogen Receptors (ERs) Originate from a Single Transcript: Studies of ER α and ER β Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells, Molecular Endocrinology, 13 (2): 307-319, 1999
- Razandi M, Pedram A, Levin ER, Plasma Membrane Estrogen Receptors Signal to Antiapoptosis in Breast Cancer, Molecular Endocrinology, 14 (9): 1434-1447, 2000

- Richette P, Corvol M, Bardin T, Estrogens, cartilage and osteoarthritis, *Joint Bone Spine*, 70: 257-262, 2003
- Richmond RS, Carlson CS, Register TC, Shanker G, Loeser RF, Functional estrogen receptors in adult articular cartilage: estrogen replacement therapy increases chondrocyte synthesis of proteoglycans and insulin-like growth factor binding protein, *Arthritis Rheum*, 43: 2081-90, 2000
- Rickard DJ, Gowen M, Cytokines in arthritis. *Arthritis and Rheumatism Council*, 1993
- Rohen JW, Lütjen-Drecoll E, Funktionelle Anatomie des Menschen, 10. Auflage, Schattauer Verlag, 2001
- Roman-Blas JA, Castañeda S, Largo R, Herrero-Beaumont G, Osteoarthritis associated with estrogen deficiency, *Arthritis Res Ther.*, 11(5):241, 2009
- Roos H, Dahlberg L, Hoerrner L, Lark M, Thonar E, Shinmei M, Lindquist U, Lohmander L, Markers of cartilage matrix metabolism in human joint fluid and serum: the effect of exercise, *Osteoarthritis Cartilage*, 3: 7-14, 1995
- Rosner IA, Goldberg VM, Getzy L, Moskowitz RW, Effects of estrogen on cartilage and experimentally induced osteoarthritis, *Arthritis Rheum*, 22: 52-8, 1979
- Roux P, Blenis J, ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68: 320-344, 2004
- Safe S, Kim K, Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways, *Journal of Molecular Endocrinology*, 41: 263 – 275, 2008
- Sandell LJ., Aigner T, Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: Cell biology of osteoarthritis, *Arthritis Res* 3(2): 107-113, 2001

- Santen RJ, Song RX, McPherson R, Kumar R, Adam L, Jeng MH, Yue W, The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 80: 239-256, 2002
- Schneider S, Schmitt G, Mau H, Schmitt H, Sabo D, Richter W, Prävalenz und Korrelate der Osteoarthrose in der BRD, *Der Orthopäde*, Springer Verlag, 34: 782–790, 2005
- Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M, SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoid acid in a cartilage-derived cell line, *J Biol Chem*, 275: 10738-44, 2000
- Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL and Prockop DJ, In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 4397-4402, 2002
- Selye H, Stress and the general adaption syndrome, *Br Med J*, 1: 1383-1392, 1950
- Siebler T, Robson H, Glucocorticoids, thyroid hormone and growth hormone interactions: implications for the growth plate, *Horm Res*, 56: 7-12, 2001
- Silberberg R, Hasler M, Stimulation of articular cartilage of young adult mice by hormones, *Pathol Microbiol*, 37: 23 – 36, 1971
- Sondergaard BC, Schultz N, Madsen SH, Bay-Jensen AC, Kassem M, Karsdal MA, MAPKs are essential upstream signaling pathways in proteolytic cartilage degradation - divergence in pathways leading to aggrecanase and MMP-mediated articular cartilage degradation, *Osteoarthritis Cartilage*, 11, 2009
- Song RX, Santen RJ, Membrane initiated estrogen signaling in breast cancer, *Biol Reprod*, 75: 9-16, 2006

- Spahn G, Wittig R, Short-Term Effects of Different Arthroscopic Techniques in the Treatment of Chondral Defects (Shaving, Coblation, and Microfacturing), *European Journal of Trauma*, 28 (6): 349-54, 2002
- Steinmeyer J, Medikamentöse Therapie der Arthrose, *Der Orthopäde*, Springer Verlag, 11: 856-65, 2001
- Stephens M, Kwan AP, Bayliss MT, Archer CW, Human articular surface chondrocytes initiate alkaline phosphatase and type X collagen synthesis in suspension culture, *J Cell Sci*, 103(Pt 4): 1111-6, 1992
- Stavis PE, Deecher DC, Suhadolnik L, Mallis LM, Frail DE, Differential effects of estradiol and estradiol-BSA conjugates, *Endocrinology*, 140: 5455-58, 1999
- Studer RK, Levicoff E, Georgescu HJ, Miller L, Jaffurs D, Evans CH, Nitric oxide inhibits chondrocyte response to IGF-I: inhibition of IGF-IR β tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279(4): 961-969, 2000
- Sukocheva OA, Wang L, Albanese N, Pitson SM, Vadas MA, Xia P, Sphingosine kinase transmits estrogen signalling in human breast cancer cells, *Mol. Endocrinol.*, 17: 2002-12, 2003
- Sun Y, Stürmer T, Günther KP, Brenner H, Incidence and prevalence of cox- and gonarthrosis in the general population, *Z Orthop Ihre Grenzgeb.*, 135(3): 184-92, 1997
- Swoboda B, Aspekte der epidemiologischen Arthroseforschung, *Der Orthopäde*, Springer Verlag, 2001
- Szego CM, Davis JS, Adenosine 3,5-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen, *Proc Natl Acad Sci USA*, 58: 1711-1718, 1967

- Talwar R, Wong BS, Svoboda K, Harper RP, Effects of Estrogen on Chondrocyte Proliferation and Collagen Synthesis in Skeletally Mature Articular Cartilage, *J Oral Maxillofac Surg*, 64:600-609, 2006
- Tankó LB, Søndergaard BC, Oestergaard S, Karsdal MA, Christiansen C, An update review of cellular mechanisms conferring the indirect and direct effects of estrogen on articular cartilage, *Climacteric*.11(1):4-16, 2008
- Thiem U, Schumacher J, Zacher J, Burmester G-R, Pientka L, Prävalenz von muskuloskelettalen Beschwerden und selbstberichteter Gelenkarthrose in der Herner Bevölkerung, *Zeitschrift für Rheumatologie*, Springer, 67: 432-439; 2008
- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J, Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells, *Endocrinology*, 146: 624–632, 2005
- Turner AS, Athanasiou KA, Zhu CF, Alvis MR, Bryant HU, Biochemical effects of estrogen on articular cartilage in ovariectomized sheep, *Osteoarthritis Cartilage*, 5: 63-9, 1997
- Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Ohkubo I, Hukuda S, Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes, *Osteoarthritis Cartilage*, 7: 560-6, 1999
- Van Saase JL, Van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA, Epidemiology of osteoarthritis: zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations, *Ann Rheum Dis*, 48: 271-80, 1989
- Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia AG, Musti AM, Picard D, Ando S, Maggiolini M, The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells, *Mol Endocrinol* 20: 631-646, 2005

Walker GD, Fischer M, Gannon J, Thompson RC Jr., Oegema TR Jr., Expression of type-X collagen in osteoarthritis, J Orthop Res, 13: 4-12, 1995

Welsch U, Lehrbuch Histologie, 1. Auflage, Urban & Fischer Verlag, 2003

Westacott CI, Sharif M, Cytokines in Osteoarthritis: Mediators or Markers of Joint Destruction?, Semin Arthritis Rheum 25(4): 254-272, 1996

Yu FY, Lu SB, Cui XM, Zhao B, Xu WJ, Yuan M, Sun MX, Zhang WT, Huang JX, Biological characterization of rabbit's articular chondrocytes by confluent culture in vitro, Zhonghua Wai Ke Za Zhi 44:848-51, 2006

Yun SP, Lee MY, Ryu JM, Song CH, Han HJ, Role of HIF-1 α and VEGF in human mesenchymal stem cell proliferation by 17 β -estradiol: involvement of PKC, PI3K/Akt, and MAPKs, Am J Physiol Cell Physiol., 296(2):C317-26, 2009

Yuasa T, Kondo N, Yasuhara R, Shimono K, Mackem S, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Transient activation of Wnt/{ β }-catenin signaling induces abnormal growth plate closure and articular cartilage thickening in postnatal mice, Am J Pathol., 175(5):1993-2003, 2009

Zellner J, Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen und Hyaluronsäure-Gelatine Kompositmatrices zur Reparatur avaskulärer Meniskusläsionen, 2006

Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Estrogen receptor β : an overview and update, Nuclear Receptor Signaling, 6: 03, 2008

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: (A) Aufbau des artikulären Knorpels. (B) Darstellung eines Chondrons (Abbildung aus Molekulare Grundlagen der Arthroseinduktion und -progression, Pullig, 2001)	3
Abbildung 1-2: Arthroseprävalenz in Deutschland (Abbildung aus Estrogens, cartilage and osteoarthritis, Richette, 2003).....	5
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des MAPK-Pathway (Abbildung der Firma Ambion)	12
Abbildung 1-4: Vereinfachte Darstellung einzelner Schritte der Chondrogenese mit den wichtigsten Markerproteinen (Abbildung aus Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation, Lefebvre, 2005)	15
Abbildung 2-1: Schematisch dargestellter grundsätzlicher Versuchsablauf in Vorbereitung auf die E2-Stimulationsexperimente.....	32
Abbildung 2-2: Schematisch dargestellter Versuchsablauf der Untersuchung des 17 β -Estradiol-Einflusses auf hMSCs während der chondrogenen Differenzierung.....	33
Abbildung 2-3: Intraoperative Jamshidi-Punktion des Beckenkamms.....	36
Abbildung 2-4: Auftrennung der Zellsuspension über den Ficoll-Gradienten.....	37
Abbildung 2-5: Gelelektrophorese-Einheit mit angeschlossener Spannungsquelle (150 V).....	53
Abbildung 2-6: Aufbau des „Sandwiches“ und Blot-Kammer	54
Abbildung 3-1: Effekte der unterschiedlichen Inkubationszeiten und Konzentrationen von 17 β -Estradiol (E2) auf mesenchymale Stammzellen während der chondrogenen Differenzierung.....	57
Abbildung 3-2: Effekte der unterschiedlichen Inkubationszeiten und Konzentrationen von 17 β -Estradiol (E2) auf mesenchymale Stammzellen während der chondrogenen Differenzierung.....	59
Abbildung 3-3: Effekte der unterschiedlichen Inkubationszeiten und Konzentrationen von 17 β -Estradiol (E2) auf mesenchymale Stammzellen während der chondrogenen Differenzierung.....	60
Abbildung 3-4: : Immunhistochemische Kollagen II-Färbung: Makroskopische Darstellung der aus hMSCs bestehenden Zellaggregaten während der chondrogenen Differenzierung;	61
Abbildung 3-5: 1,9Dimethylmethylenblau-Färbung der sulphatierten Glykosaminoglykane: Makroskopische Darstellung der aus hMSCs bestehenden Zellaggregaten während der chondrogenen Differenzierung;.....	63

Abbildung 3-6: Western Blot-Analyse: Expressionsnachweis des klassischen ER- α bei hMSCs während der chondrogenen Differenzierung (d0-1);	64
Abbildung 3-7: Western Blot-Analyse: Expressionsnachweis des klassischen ER- β bei hMSCs während der chondrogenen Differenzierung (d0-1);	64
Abbildung 3-8: Western Blot-Etablierung ERK.....	65
Abbildung 3-9: Western Blot-Etablierung ERK.....	65
Abbildung 3-10: Western Blot-Etablierung: Vergleich der Blockierlösungen.....	66
Abbildung 3-11: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-ERK (unten) und Phospho-ERK (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden 9 min mit 17 β -Estradiol unterschiedlicher Konzentrationen sowie zur Kontrolle (K) ohne E2-Zusatz inkubiert;	67
Abbildung 3-12: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-ERK (unten) und Phospho-ERK (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden 90 min mit 17 β -Estradiol unterschiedlicher Konzentrationen sowie zur Kontrolle (K) ohne E2-Zusatz inkubiert;	67
Abbildung 3-13: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-p38 (unten) und Phospho-p38 (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden 9 min mit 17 β -Estradiol unterschiedlicher Konzentrationen sowie zur Kontrolle (K) ohne E2-Zusatz inkubiert;	68
Abbildung 3-14: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-p38 (unten) und Phospho-p38 (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden 90 min mit 17 β -Estradiol unterschiedlicher Konzentrationen sowie zur Kontrolle (K) ohne E2-Zusatz inkubiert;	69
Abbildung 3-15: Western Blot-Etablierung JNK.....	70
Abbildung 3-16: Western Blot Etablierung JNK.....	70
Abbildung 3-17: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-ERK (unten) und Phospho-ERK (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden für Zeiträume zwischen 1 und 240 min mit 17 β -Estradiol der Konzentration 10 \cdot 8 M sowie zur Kontrolle (K) ohne E2-Zusatz inkubiert;	71
Abbildung 3-18: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-p38 (unten) und Phospho-p38 (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden für Zeiträume zwischen 1 und 240 min mit 17 β -Estradiol der Konzentration 10 \cdot 8 M sowie zur Kontrolle (K) ohne E2-Zusatz inkubiert;	72
Abbildung 3-19: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-ERK (unten) und Phospho-ERK (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden 9 und 90 min mit E2-BSA und ICI182,780 (s. Legende) sowie zur Kontrolle ohne E2-Zusatz inkubiert;	73

Abbildung 3-20: Western-Blot-Analyse des Aktivierungslevel von Total-p38 (unten) und Phospho-p38 (oben): Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden 9 und 90 min mit E2-BSA und ICI182,780 (s. Legende) sowie zur Kontrolle ohne E2-Zusatz inkubiert;.....	74
Abbildung 3-21: β -Aktin als Western Blot-Ladekontrolle: Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden 9 min (linke Hälfte) und 90 min (rechte Hälfte) mit 17β -Estradiol unterschiedlicher Konzentrationen sowie zur Kontrolle (K) ohne E2-Zusatz inkubiert;.....	75
Abbildung 3-22: β -Aktin als Western Blot-Ladekontrolle: Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden für Zeiträume zwischen 1 und 240 min mit 17β -Estradiol der Konzentration 10^{-8} M sowie zur Kontrolle (K) ohne E2-Zusatz inkubiert;.....	75
Abbildung 3-23: β -Aktin als Western Blot-Ladekontrolle: Humane MSC während der chondrogenen Differenzierung wurden für 9 und 90 min mit E2-BSA und ICI182,780 (s. Legende) sowie zur Kontrolle ohne E2-Zusatz inkubiert;.....	76
Abbildung 4-1: 17β -Estradiol-abhängige Chondrogenese-Hemmung über den nicht-klassischen Weg, vermittelt über den membranständigen Rezeptor GPR30, welcher von E2-BSA und ICI182,780 aktiviert wird (grauer Bereich der Graphik). Im weißen Bereich wird der klassische $ER\alpha/\beta$ -Wirkmechanismus dargestellt. (modifiziert nach Jenei-Lanzl, 2010).....	85

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1-1: Einteilung der Zytokine.....</i>	<i>7</i>
<i>Tabelle 2-1: Geräte und Hersteller</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 2-2: Gebrauchsreagenzien und Hersteller.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 2-3: Histologiematerialien und Hersteller.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 2-4: Zellkulturmedien, Mediumzusätze und Seren.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 2-5: Kits und Assays.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 2-6: Western Blot-Materialien und Hersteller</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 2-7: Primär-Antikörper Western Blot.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 2-8: Sekundär-Antikörper Western Blot.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 2-9: Gruppeneinteilung während 21tägiger Chondrogenese zur anschließenden Kollagen II-, GAG- und DNA-Bestimmung sowie zu histologischen Auswertung.....</i>	<i>35</i>

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Macht, Corinna geboren am 09.08.1985 in Erlangen erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar Geld oder geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

Corinna Macht

Danksagung

Mein Dank geht an alle, die mich während meiner Promotion unterstützt haben, im Besonderen an:

Prof. Dr. Michael Nerlich: Für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Abteilung durchführen zu können.

Prof. Dr. Peter Angele: Für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Erstgutachtens.

Dr. Thomas Dienstknecht: Für die Betreuung und Korrektur meiner Dissertation, die intensive, kritische und stetige Beratung bei der Erstellung der Arbeit, außerdem für so manchen Motivationsschub und ein immer offenes Ohr.

Dr. rer. nat. Richat Kujat: Für die gute Kooperation und die Unterstützung in sämtlichen Angelegenheiten im Labor.

Daniela Drenkhard: Für die große Unterstützung und kompetente Beratung während der experimentellen Arbeiten.

Zsuzsa Jenei-Lanzl: Für die freundliche Anleitung bei der statistischen Auswertung und der graphischen Darstellung meiner Ergebnisse und so manchen guten Ratschlag.

Wendelin Macht, meinen Bruder: Für die geduldige Hilfe beim Erstellen des Layouts dieser Arbeit.

Lebenslauf

Corinna Macht

email: Corinna.Macht@med.uni-muenchen.de

PERSÖNLICHE DATEN

GEBOREN AM

09. AUGUST 1985

GEBURTSORT

ERLANGEN

BERUF

SEIT 06/2011

ASSISTENZÄRZTIN AM KLINIKUM DER
UNIVERSITÄT MÜNCHEN, KLINIK UND
POLIKLINIK FÜR STRAHLENTHERAPIE
UND RADIOONKOLOGIE

STUDIUM

11/2010

ZWEITER ABSCHNITT DER ÄRZTLICHEN
PRÜFUNG, NOTE „SEHR GUT“

10/2004 – 11/2010

STUDIUM DER HUMANMEDIZIN AN DER
UNIVERSITÄT REGENSBURG

10/2006 – 11/2010

KLINISCHER ABSCHNITT AM UNIVERSI-
TÄTSKLINIKUM REGENSBURG

09/2006

ERSTER ABSCHNITT DER ÄRZTLICHEN
PRÜFUNG, NOTE „SEHR GUT“

10/2004 – 09/2006

VORKLINISCHER ABSCHNITT AN DER
UNIVERSITÄT REGENSBURG